



Revista Colombiana de Biotecnología

ISSN: 0123-3475

revcbib_bog@unal.edu.co

Universidad Nacional de Colombia

Colombia

Celis Bustos, Yamile Adriana; Rubio, Vivian Vensa; Camacho Navarro, María Marcela

Perspectiva histórica del origen evolutivo de la resistencia a antibióticos

Revista Colombiana de Biotecnología, vol. XIX, núm. 2, julio-diciembre, 2017, pp. 105-117

Universidad Nacional de Colombia

Bogotá, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77654661011>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Perspectiva histórica del origen evolutivo de la resistencia a antibióticos

Evolutionary origin of antibiotic resistance, a historical perspective

*Yamile Adriana Celis Bustos**, *Vivian Vanesa Rubio***, *María Marcela Camacho Navarro****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.69501

Resumen

La resistencia a antimicrobianos representa un aspecto natural de evolución bacteriana, que puede resultar de mutaciones o por adquisición de genes foráneos. Hay diferentes posturas sobre el origen de ésta resistencia que explican la habilidad de estos microorganismos de adquirir nuevas características. Las teorías de la evolución de Lamarck y Darwin, han dado pie a experimentos diseñados para explorar el origen de la variación bacteriana y surgimiento de nuevas características. Estos estudios muestran que la resistencia está relacionada con mutaciones en genes cromosomales y/o la transferencia de elementos genéticos extracromosomales, que se expresan según la presión antibiótica ejercida. Esta revisión recopila los principales experimentos y las conclusiones derivadas para explicar el fenómeno de resistencia a antibióticos.

Palabras clave: resistencia a antibióticos, evolución, adaptación, mutación, transferencia horizontal.

Abstract

Antimicrobial resistance is a natural aspect of bacterial evolution that can result from mutations or acquisition of foreign genes. Various views on the origin of this resistance explain the ability of these organisms to acquire new features. Lamarck and Darwin's theories of evolution have led to experiments designed to explore the origin of bacterial variation and the emergence of new features. These experiments show that antimicrobial resistance is related to mutations in chromosomal genes and/or transfer of extrachromosomal genetic elements that can be expressed based on the antibiotic pressure exerted. The main experiments and findings that seek to explain the phenomenon of antibiotic resistance are reviewed here in.

Key words: antibiotic resistance, evolution, adaptation, mutation, horizontal gene transfer.

Recibido: diciembre 16 de 2016 **Aprobado:** noviembre 20 de 2017

* Bacterióloga, MSc., Ciencias-Microbiología, PhD Salud Pública, Universidad Nacional de Colombia, yacelisb@unal.edu.co.

** Bacterióloga, MSc., Ciencias-Microbiología, Universidad Nacional de Colombia, wrubio@unal.edu.co.

*** Médico, PhD., Filosofía Biología de Schistosoma, profesora titular, Departamento de Biología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, mmcamachon@unal.edu.co.

Introducción

La resistencia a antibióticos se define como la capacidad de un microorganismo de tolerar concentraciones de antibióticos clínicamente relevantes (Choffnes *et al.*, 2010). El desarrollo de esta característica en microorganismos sensibles y expuestos a antimicrobianos es inevitable ya que representa un aspecto natural de la evolución bacteriana. No obstante, este proceso se ha acelerado y expandido globalmente por la presión ejercida por exposición a contaminantes ambientales, uso de metales pesados, desinfectantes y antimicrobianos (Choffnes *et al.*, 2010; Courvalin, 2008; Depardieu *et al.*, 2007; Gillings *et al.*, 2015; Lederberg, 2000; Stokes & Gillings, 2011). Estos últimos pueden promover la expresión de genes presentes en el genoma o en elementos extracromosomales, favorecer mutaciones puntuales en genes, o el traspaso de nuevos genes de resistencia por transferencia horizontal (Davies & Davies, 2010; Levy, 2005; Levy & Marshall, 2004; Stokes & Gillings, 2011).

La resistencia se convierte en un problema de salud pública cuando cepas resistentes comprometen la efectividad de la terapia antibiótica prescrita. El nivel de exposición del patógeno al antibiótico influye en la selección de microorganismos resistentes (Kohanski *et al.*, 2010). La diseminación de bacterias resistentes depende de su transmisión, así como de la cantidad y distribución de antibióticos liberados al ambiente. Los microorganismos resistentes presentes conforman un gran reservorio de genes que pueden potencialmente transferir resistencia a patógenos humanos, animales y ambientales (Keen & Montforts, 2012; Marshall & Levy, 2011; Martinez, 2009).

El origen de la resistencia a antimicrobianos ha sido explicado desde diferentes posturas teóricas. Términos como adaptación y entrenamiento han sido utilizados para entender la habilidad de estos microorganismos de adquirir nuevas características. Bacteriólogos y bioquímicos apoyaron la teoría propuesta por Lamarck y genetistas la de Darwin. A partir de 1900 se desarrollaron experimentos para evidenciar el origen de la variación bacteriana y surgimiento de nuevas características co-

mo la resistencia a antibióticos. Estos experimentos sentaron las bases para implicar tanto al ambiente, como a cambios genéticos en la aparición de la resistencia a antimicrobianos. Además, fenómenos de multirresistencia como el identificado por Watanabe en 1963 llevaron a analizar otras características, como la transferencia de información de una bacteria a otra y los genes involucrados en su diseminación y expresión. Estos estudios mostraron que la resistencia está relacionada con transferencia de elementos extracromosomales, que incluyen múltiples genes de resistencia y se expresan según la presión antibiótica ejercida. Más aún, mostraron que algunos elementos pueden ser transferidos entre bacterias de la misma o de diferente especie sin que medie replicación bacteriana. En esta revisión se describen los principales experimentos y propuestas hechas para explicar el origen evolutivo de la resistencia a antibióticos y algunos de sus mecanismos.

Dos grandes pilares teóricos de la evolución de especies

Históricamente dos teorías, han explicado la evolución; cómo los organismos adquieren características nuevas o adaptan las constitutivas para sobrevivir y mantenerse en un ambiente determinado. La teoría de adaptación de Lamarck expuesta en 1809, se basa en la premisa que la evolución está dada por cambios fenotípicos y genotípicos a lo largo del tiempo, generados por variaciones ambientales, que le permiten al organismo adaptarse al medio modificado; éstas serían deterministas y se transmitirían de una generación a otra (Koonin & Wolf, 2009). Por otro lado, está la teoría de selección natural de Darwin que da mayor importancia a cambios al azar, que proporcionan características de ventaja a ciertos organismos. Sobreviven los que ante una presión x presentan la característica que les permite adaptarse (aptos) y son seleccionados sobre aquellos que carecen de la característica (Creager, 2007; Koonin & Wolf, 2009).

Evolución bacteriana

Curiosamente la comprensión sobre las causas de la resistencia a antibióticos permitió dilucidar la variación bacteriana y su evolución (figura 1), donde explicaciones de adaptación y entrenamiento han sido argumen-

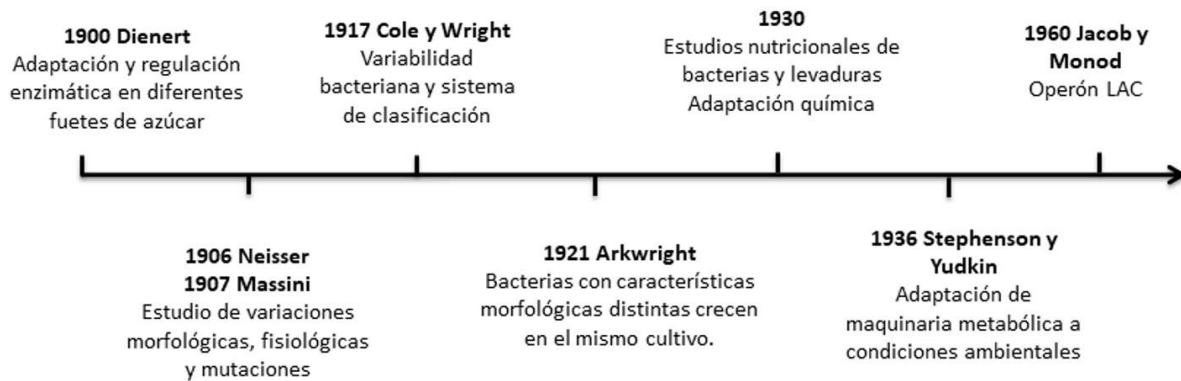


Figura 1. Línea de tiempo de los principales eventos que permitieron evidenciar la evolución bacteriana.

tadas. Estos debates surgieron cuando se reconocieron las bacterias como organismos vivos con material genético similar al de células eucariotas. Las bacterias se reproducen asexualmente por fisión binaria, donde el material genético es transferido verticalmente de la célula madre a la hija. Sin embargo, pueden también recibir material genético por transferencia horizontal de genes (HGT) a través de elementos genéticos móviles (transposones, plásmidos, bacteriófagos). Hoy sabemos que el patrón de evolución bacteriano está relacionado con la organización de su genoma, tasa de mutación y sistemas de HGT (Rosselló-Mora, 2003; Rosselló-Mora & Amann, 2001), desconocidos cuando se iniciaron los primeros estudios de su caracterización.

La clasificación bacteriana se basó en herramientas usadas en eucariotas, pero al reconocer las diferencias de organización celular, se desarrollaron técnicas y un esquema taxonómico de características morfológicas. Bacterias con la misma forma se agruparon dentro de una misma especie aunque, al analizar su respuesta fisiológica en el mismo medio ésta era diferente, surgiendo la necesidad de explicar por qué. Estos análisis fueron desarrollados por bacteriólogos y bioquímicos de la época, quienes asumían que las condiciones a las cuales eran expuestas inducían cambios que se mantenían de una generación a otra, apoyando la visión Lamarckiana.

El error de los bacteriólogos al investigar procesos de evolución y variación bacteriana según Amsterdamska,

partió de los conceptos utilizados y su enfoque biomédico, dado que orientaron sus estudios en aislamiento, caracterización de patógenos y análisis terapéutico. Para los bacteriólogos, las bacterias adquirían material genético sólo por división transversal (fisión binaria). Asimismo seguían los postulados de Cohn-Koch de monomorfismo, que incluían conservación morfológica o fisiológica dentro de una especie, argumentando que organismos individuales de una especie dada, al tener las mismas características crecían igual en medios específicos y causaban enfermedad sin sufrir cambios (Amsterdamska, 1987; Amsterdamska, 1991; Hadley, 1927).

Cole y Wright en 1916, sustentaron variabilidad bacteriana y un nuevo sistema de clasificación basados en caracteres morfológicos y fisiológicos, acorde con Winslow, para agrupar por especie microorganismos con propiedades únicas diferenciables, por género especies relacionadas con características comunes y por familia a géneros con caracteres similares. La variabilidad identificada en cultivos bacterianos llamó la atención y así se identificaron dos tipos de variaciones ocasionadas dentro de la célula o impuestas por condiciones ambientales (Cole & Wright, 1916).

El análisis de características morfológicas y fisiológicas de bacterias mostró su amplia plasticidad, hallazgo que contrastaba con el monomorfismo. Se demostró que un cultivo bacteriano es una mezcla de poblaciones con diferentes características fisiológicas y cómo el ambien-

te influye en la multiplicación y subsistencia de subpoblaciones; bajo ciertas condiciones algunos biotipos se pierden o son minoría, mientras otros se mantienen y adaptan (Cole & Wright, 1916). A la par del desarrollo de herramientas de análisis de células eucariotas, se implementaron estrategias de estudio en bacterias. La identificación de mutaciones en plantas, llevó al análisis de éstas en bacterias, resaltando la importancia de caracterizar subpoblaciones que hacen parte de un cultivo.

Los primeros estudios realizados para explicar variaciones morfológicas y fisiológicas en bacterias y mutaciones como causa de éstas fueron planteados en 1906 y 1907, en donde analizaron ¿Por qué aislamientos de *Escherichia coli* que no fermentaban lactosa, después de ser sometidos a crecimiento en medio con lactosa adquirían esta característica? Según Massini esta habilidad era resultado de mutaciones, y por esta razón fueron denominadas *E. coli* mutables, sin evidencia genética, ni análisis profundo de cómo surge esta variante (Amsterdamska, 1991; Hadley, 1927; Yudkin, 1936). Con base en estos hallazgos se desarrollaron otros experimentos para analizar los cambios identificados en diferentes cultivos bacterianos.

En 1921 Arkwright fue el primero en demostrar que en cultivos de una misma especie era posible encontrar bacterias con diferentes características morfológicas e identificó dos tipos de colonias que denominó lisas o rugosas. Orientado por la pregunta si estas diferencias indicaban presencia de microorganismos con ventajas adaptativas, las bacterias identificadas fueron sometidas a crecimiento bajo diferentes condiciones concluyendo que estas dos formas se diferenciaban en morfología, crecimiento, reacciones serológicas, bioquímicas y virulencia, donde las colonias lisas tenían ventajas adaptativas, al ser resistentes a la acción lítica de bacteriófagos, a diferencia de las rugosas (Arkwright, 1921). Con estos resultados, bacteriólogos en diferentes instituciones se cuestionaron si era posible transformar bacterias con características morfológicas y adaptativas específicas (lisas, no virulentas) en más aptas (rugosas y virulentas). Utilizando como modelo *Streptococcus pneumoniae*, Avery indujo esto, e identificó que la información que generaba dichos cambios, se encontraba en una frac-

ción no proteica heredable de la bacteria, y transferible de una bacteria a otra por contacto de vivas no virulentas con muertas virulentas. Hoy este proceso se denomina transformación, DNA de la bacteria lisada es captado por la bacteria viva proporcionándole virulencia y cambios morfológicos. Esta fue la primera evidencia del papel del DNA como material genético, de la transferencia de caracteres heredables y la capacidad bacteriana de captar información genética para sobrevivir en un ambiente determinado (Amsterdamska, 1993; Avery et al., 1943).

Para 1930 las investigaciones se enfocaron en estudios nutricionales de bacterias y levaduras, representando la variación en términos de adaptación química. La hipótesis planteada para explicar el proceso de variación era que una población de células en contacto con un sustrato adquiere con el tiempo enzimas necesarias para metabolizarlo, adaptación enzimática, donde hay enzimas adaptativas sintetizadas por las células cuando están con contacto con el sustrato y constitutivas presentes sin tener en cuenta el sustrato (Barnett, 2004; Creager, 2007).

Dienert y Monod se preguntaron ¿Cómo se daba la adaptación y regulación enzimática en diferentes fuentes de azúcar? Para responder este interrogante cultivaron levaduras con diferentes azúcares y analizaron su tasa de fermentación. Encontraron que la tasa de fermentación de galactosa depende del azúcar presente en el medio de cultivo, a diferencia de la tasa de fermentación de glucosa que es independiente. Además indicaron la relación entre la fuente de azúcar (galactosa, lactosa o melibiosa) en el medio de cultivo y la actividad enzimática (galactosidasa); así microorganismos que crecían en galactosa, al cultivarlos en glucosa perdían dicha actividad. Estos resultados enfatizan el papel del sustrato en la tasa de fermentación de galactosa y el desarrollo de la actividad enzimática (galactosidasa), asegurando que la actividad enzimática era adaptativa. A pesar de los hallazgos, la metodología utilizada no permitió responder la pregunta planteada; con estos experimentos se documentó como estas levaduras se pueden adaptar a un medio específico pero no el papel del azúcar utilizado en la regulación de la ex-

presión de la enzima. Por esta razón Stephenson y Yudkin los refutaron, argumentando falta de cuantificación que limitaba la interpretación (Amsterdamska, 1987; Barnett, 2004; Dienert, 1900; Stephenson & Gale, 1937).

Para dar una explicación más rigurosa a lo planteado por Dienert y Monod, Stephenson y Yudkin enfatizaron en la fisiología, postulando que las bacterias adaptaban su maquinaria metabólica a las oportunidades ambientales (Dienert, 1900; Stephenson & Yudkin, 1936; Yudkin, 1936). Así, analizaron ¿En qué condiciones se desarrollaban las enzimas que fermentaban galactosa y glucosa en *E. coli* y qué relación había entre la formación, actividad enzimática y multiplicación celular? Concluyeron que la acción de dichas enzimas se daba por un proceso de adaptación química. Stephenson invirtió tiempo y esfuerzo para explicar cómo la glucosa suprime la síntesis de galactosidasa, sin aclarar el mecanismo de adaptación y variación (Kohler, 1985; Stephenson & Gale, 1937).

Hacia 1960 Jacob y Monod explicaron el metabolismo de lactosa en *E. coli* bajo el control de un grupo de genes que denominaron operón Lac, constituido por tres genes: promotor, represor y operador. Este operón es regulado por la disponibilidad de lactosa y glucosa del medio. Así, cuando hay lactosa (inductor) se produce galactosidasa, promoviendo transcripción y síntesis de la enzima. Otros compuestos del medio pueden actuar como represores inhibiendo la transcripción de la enzima (Jacob, 1960; Jacob et al., 2005; Monod, 1956). Estos hallazgos mostraron que la acción de la galactosidasa es un proceso complejo que para ser entendido requería análisis genético.

Explicaciones a la resistencia bacteriana

Basándose en estos estudios, se llevaron a cabo experimentos en bacterias aisladas de pacientes, para mostrar que la resistencia identificada, era causada por acción de enzimas adaptativas que hidrolizaban el antibiótico y surgían en microorganismos susceptibles si eran sometidos a diferentes concentraciones del medicamento (entrenamiento). Desde 1945 en adelante hubo una ráfaga de publicaciones sobre el crecimiento y carac-

terísticas de resistencia a antibióticos en microorganismos aislados de pacientes y cepas de laboratorio, que explicaban cómo las bacterias pueden adaptarse y multiplicarse en presencia de antimicrobianos aunque inicialmente inhibieran su crecimiento (Fildes & Whitaker, 1948; Hadley, 1927).

En 1940 Luria y Delbrück dieron una explicación diferente a la variación y resistencia a antibióticos, tomando de la física de radiación un enfoque estadístico para sus análisis. Partieron de las observaciones hechas por D'Hérelle y otros investigadores, quienes afirmaban que la interacción de bacterias con bacteriófagos inducía variantes resistentes que se adaptaban al medio, en contraste con lo expuesto por Burnet, quién aseguraba que las bacterias resistentes son resultado de mutaciones pre-existentes a la interacción bacteria-bacteriófago, las cuales eran seleccionadas por acción lítica del virus que eliminaba a las susceptibles (Hadley, 1927; Luria & Delbrück, 1943, Burnet, 1927). Estas dos hipótesis llevaron a Luria y Delbrück a plantear las siguientes preguntas: ¿Cómo se origina la resistencia a la infección por bacteriófagos y cuál de las hipótesis antes expuestas puede explicar dicha resistencia? El experimento consistió en inocular un número pequeño de bacterias a partir de una misma colonia, en diferentes tubos de ensayo. Después de un periodo de crecimiento, inocularon el mismo volumen de bacterias de cada tubo de ensayo en diferentes placas con agar que contenía el bacteriófago. Argumentando que sí la resistencia era generada por la interacción bacteria-virus, es decir por un proceso de adaptación, en todas las placas se esperaría un número similar de bacterias resistentes. Sin embargo, los resultados obtenidos luego del análisis estadístico mostraron que el número de colonias resistentes variaba drásticamente de una placa a otra a pesar de que todas fueron inoculadas con el mismo número y bajo las mismas condiciones. Luria y Delbrück explicaron estos resultados como una tasa constante de mutaciones aleatorias heredables en cada generación bacteriana de cada tubo, las cuales surgieron de manera independiente a la interacción con el virus, apoyando así la hipótesis planteada por Burnet y Gratia. A pesar de los resultados obtenidos, se expuso la necesidad de estudiar a fondo la resistencia identificada en bacterias que

crecían tiempo después de la lisis de bacterias sensibles, porque la atribuían a un mecanismo más complejo (Luria & Delbrück, 1943). Para esta época no se conocía el papel de los elementos genéticos extracromosomales en la resistencia bacteriana, ni se contaba con herramientas para profundizar en este aspecto.

Los resultados de estos experimentos se convirtieron en un hito para la genética, ya que pareció ser una de las primeras demostraciones claras que la herencia en bacterias no era Lamarckiana. Sin embargo, no todos los genetistas bacterianos estuvieron de acuerdo con este análisis. Sonneborn señaló que lo que estos autores vieron como mutaciones espontáneas podía ser resistencia adquirida que persistió durante varias generaciones (Creager, 2007).

Demerec usando el diseño experimental planteado por Luria y Delbrück estudió el origen de la resistencia a penicilina en *Staphylococcus aureus* señalando la analogía entre resistencia bacteriana a agentes infecciosos (bacteriófagos) y resistencia a sustancias químicas (antibióticos). El experimento mostró variación amplia en el número de bacterias resistentes a penicilina en muestras de cultivos independientes, lo cual apoyaba la interpretación genética del origen de la resistencia y la acción de la penicilina como un agente selectivo que inhibe bacterias no resistentes. Demerec señaló que era posible aumentar el grado de resistencia al antibiótico, exponiendo cepas resistentes a alta concentración de penicilina y lo interpretó como la suma del efecto de varios factores genéticos independientes sometidos a mutaciones consecutivas sustentado en las explicaciones expuestas por Luria y Delbrück (Demerec, 1945; Demerec, 1948).

El uso de la prueba de fluctuación, fue de gran ayuda para los genetistas bacterianos. Luria extendió este enfoque para documentar que las mutaciones eran responsables de la resistencia a sulfonamidas en *S. aureus* y Demerec mostró el origen genético de la resistencia a estreptomicina. Así armados con esta prueba, los genetistas bacterianos desafiaron a los bacteriólogos en su propio terreno: la adaptación nutricional (Creager, 2007). A pesar de la aparente contundencia de estos resultados y de los datos cuantitativos que arrojaron, no

quedaba claro si el único mecanismo responsable de variación bacteriana y por tanto del origen de la resistencia a antibióticos era mutacional, y si se podía explicar la resistencia sólo desde la selección natural.

La aparición de multiresistencia a antibióticos sembró dudas sobre la explicación mutacional y selección natural como únicos argumentos a este fenómeno, porque si bien podía sugerirse como mutaciones múltiples al azar seleccionadas por una presión ambiental específica, otras opciones eran también plausibles. Las primeras bacterias multiresistentes (*Shigella*) de pacientes con disentería se identificaron en Japón, generando un problema de salud pública serio por el fracaso terapéutico y la diseminación de estos microorganismos (Watanabe, 1963). En 1959 se demostró que la multiresistencia era transferida entre aislamientos de *Shigella* y *E. coli* al combinarlos en cultivo. Esto indujo la pregunta ¿Cómo se llevaba a cabo la transferencia de multiresistencia de un microorganismo a otro? Para explicar ésta y otras características, Tatum y Lederberg presentaron evidencia de cómo se transfiere horizontalmente información genética entre bacterias por contacto directo. Este resultado controvertiría la explicación de la resistencia antibiótica desde la selección natural del más apto y retomaría postulados Lamarckianos de adaptación (Lederberg, 1947; Tatum & Lederberg, 1947).

Para esta época ya se aceptaba que la herencia en bacterias dependía de la existencia de genes, pero no era claro si la transferencia de éstos se comportaba igual que en células eucariota y, sí la leyes de herencia Mendeliana eran extrapolables a estos microorganismos o, dependían de factores extranucleares como los ya identificados en algunas bacterias y plantas (Lederberg & Lederberg, 1952; Tatum & Lederberg, 1947). Tatum y Lederberg después de una serie de experimentos concluyeron que no era posible hacer una analogía entre la herencia de caracteres bacterianos y el proceso mendeliano e identificaron un nuevo proceso de transferencia horizontal de información genética el cual se llevaba a cabo por contacto directo entre bacterias (conjugación), sin importar su especie e independiente de su replicación.

Tatum y Lederberg se preguntaron luego ¿Cómo se llevaba a cabo la transferencia de información genética entre bacterias? Para responder, partieron de dos cepas distintas de *E. coli* K-12 con diferentes requerimientos nutricionales. Después de sembrarlas juntas durante un tiempo corto y repicarlas a un medio de cultivo mínimo, observaron el crecimiento de bacterias sin ningún requerimiento nutricional (Met⁺, Bio⁺, Thr⁺, Leu⁺) procedentes del cultivo mixto. La aparición de estas bacterias se debía a recombinación de información, por contacto directo, donde la cepa donante pasaba información genética a la receptora. Este mecanismo de recombinación dependía de un factor extracromosómico, denominado en 1941 por Wright plasmagen en contraste a los genes nucleares y también conocido como factor F (factor de fertilidad), el cual se replicaba independientemente del cromosoma (Hayes, 1952; Lederberg & Lederberg, 1952; Lederberg, 1952; Tatum & Lederberg, 1947).

Más adelante Davis diseña otro experimento para someter a prueba la hipótesis del contacto bacteria-bacteria. En este trabajo se inocularon bacterias con diferentes requerimientos nutricionales en un tubo en forma de U, dividido en la mitad por una membrana que permitía flujo de medio de cultivo e impedía paso de bacterias de un compartimiento a otro. Davis observó que al inocular las mismas cepas bajo las mismas condiciones, pero sin contacto directo, no era posible obtener bacterias recombinantes sin requerimientos nutricionales, lo que sustentaba la necesidad de contacto directo propuesta por Tatum y Lederberg para la transferencia (Davis, 1950; Hayes, 1952; Tatum & Lederberg, 1947).

Luego Watanabe determinó el papel de plasmagenes en la multiresistencia, encontrando que éstos transferían múltiples genes y se localizaban a nivel citoplasmático; por esta razón los denominó factor R (resistencia), mientras otros investigadores lo llamaron episoma. El análisis de estos elementos evidenció que la transferencia de información genética se llevaba a cabo mediante contacto directo (conjugación). Además, que estos elementos transportaban varios tipos de genes que le proporcionan a las bacterias flexibilidad genética (Watanabe, 1963).

En 1952 Lederberg propuso cambiar el término de episoma a plásmido, limitando el uso del primero para elementos extracromosomales que se integran al cromosoma. Se reconoció a partir de esto, que los plásmidos juegan un papel importante en la evolución bacteriana, en especial en transferencia de resistencia a antibióticos y patogenicidad. No obstante, durante un tiempo no fueron reconocidos como agentes involucrados en la evolución bacteriana, ya que se creía que ésta resultaba de la replicación bacteriana, es decir por transferencia vertical de información genética. Microbiólogos y genetistas bacterianos se enfocaron en el análisis y caracterización de elementos genéticos extracromosomales involucrados en herencia citoplasmática (Cohen, 1993; Lederberg, 1998).

Con el desarrollo de nuevas técnicas de análisis, la dicotomía de adaptación (Lamarck) versus mutación (Darwin) empezó a disolverse. Los genetistas bacterianos fieles defensores de la teoría de selección natural, empezaron a utilizar los argumentos de adaptación para explicar la herencia citoplasmática. Por esta razón trabajos posteriores se enfocaron en el estudio de plásmidos de resistencia y el papel de la transferencia horizontal en la evolución bacteriana (Cohen, 1993; Denamur *et al.*, 2000; Hayes, 1952; Lederberg, 1998; Pál *et al.*, 2005; Watanabe, 1963).

Las herramientas de análisis genómico desarrolladas para estudios genéticos, demostraron la alta frecuencia de transferencia horizontal de genes entre bacterias; éstas obtienen DNA del ambiente a través de bacteriófagos y plásmidos que sirven como vehículos o directamente por transformación, el DNA es adquirido desde el ambiente para que bacterias sometidas a una presión selectiva particular (exposición a antibióticos) se adapten. La transferencia horizontal de genes es un mecanismo esencial para proporcionar plasticidad genética en muchas especies de bacterias. La habilidad de la bacteria para adaptarse a ambientes nuevos, es resultado de la adquisición de genes a través de transferencia horizontal, junto con alteración de las funciones de genes pre-existentes a través de mutaciones puntuales y transmisión vertical (Stokes & Gillings, 2011; Sykes, 2010).

Análisis por Diversilab

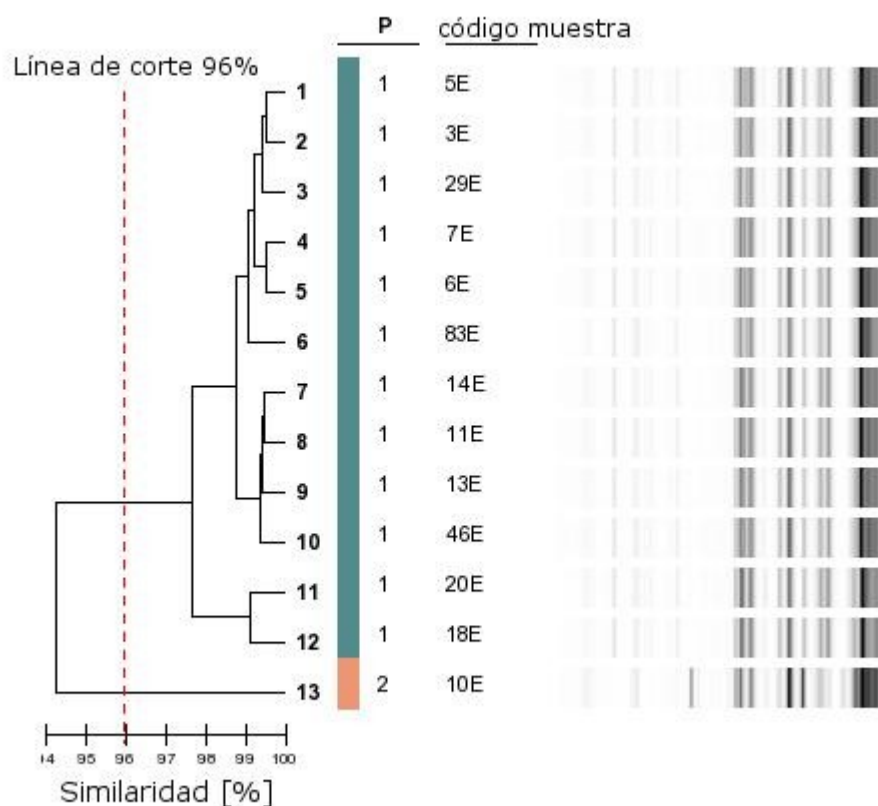


Figura 2. Dendrograma de aislamientos de *E. faecalis* resistentes a quinolonas. Los datos muestran 13 patrones genéticos (p) agrupados en dos genotipos obtenidos por rep-PCR. La figura fue elaborada basada en el análisis de los patrones con el sistema DiversiLab. *Sample ID*, número de muestra asignado en el estudio. La escala horizontal (94-100) indica el nivel de similitud de los patrones expresado en porcentaje. Patrones con porcentaje de similitud mayor al 97% se identifican como clones.

Mecanismos de resistencia a antibióticos

Para explicar mejor los mecanismos involucrados en la aparición y diseminación de resistencia a antibióticos se parte del genoma bacteriano que está compuesto por un cromosoma, donde se encuentra toda la información necesaria para el ciclo de vida de la bacteria, más elementos genéticos extracromosomales. Entre estos últimos se encuentran plásmidos, secuencias de inserción, transposones e integrones, donde se ubican genes que, bajo ciertas circunstancias favorecen la supervivencia (Lederberg, 2000). El cromosoma es heredado verticalmente por los descendientes de la bacteria mientras los elementos genéticos extracromosomales pueden ser transferidos tanto vertical como horizontalmente (Courvalin, 2008; Depardieu *et al.*, 2007).

Las mutaciones cromosomales pueden ocurrir en la secuencia de nucleótidos de genes estructurales, blanco de acción de algunos antibióticos. Ejemplos de esto son transcriptasa y rifampicina, topoisomerasa tipo II y quinolonas, proteína ribosomal S12 y estreptomicina. Esta resistencia es modulada por la presencia ambiental del antibiótico. Mutaciones en promotores o módulos de regulación (sistemas de regulación de dos componentes) son conocidas como mutaciones cuantitativas. Además, los antibióticos generan presión selectiva para mantener bacterias resistentes e inducir transferencia horizontal de genes de resistencia entre bacterias. Así, concentraciones subinhibitorias de penicilina aumentan

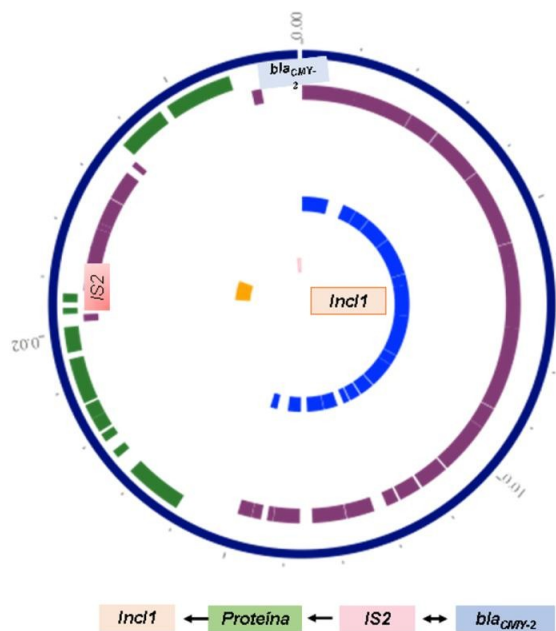


Figura 3. Entorno genético del gen *bla*_{CMY-2}. Se identificó el gen en un plásmido conjugativo del grupo de incompatibilidad *IncI1*, acompañado corriente arriba de una secuencia de inserción. La figura fue generada utilizando el software PATRIC 3.3.0.

la transferencia de DNA plasmídico de *E. coli* a *S. aureus* y *Listeria monocytogenes* (Courvalin, 2008).

La evolución de bacterias sensibles a resistentes se da básicamente por la aparición de microorganismos resistentes o la diseminación de genes de resistencia, aunque la aparición de microorganismos resistentes puede estar influenciada por la diseminación de genes de resistencia. Por tanto, el surgimiento de microorganismos resistentes, es un aspecto particular de la evolución bacteriana y se han identificado tres niveles de diseminación de resistencia según el vector: bacterias (diseminación clonal), plásmidos (transferencia replicativa) o genes (transposición replicativa).

En un estudio desarrollado por nuestro grupo de investigación en una granja porcícola se encontró que el uso de antimicrobianos en producción animal promueve la aparición de microorganismos resistentes a antimicrobianos en la flora gastrointestinal de animales y en muestras de residuos de corral (Celis 2016; Rubio, 2016). Entre los aislamientos obtenidos se encontraron los tres niveles de diseminación descritos.

Se documentó diseminación clonal en 12/13 aislamientos de *Enterococcus faecalis* con mutaciones en los genes *gyrA* y *ParC* que confieren resistencia a quinolonas basándonos en el análisis de relaciones genéticas entre aislamientos que indica un porcentaje mayor a 97 que se consideró indicativo de clonalidad (figura 2; Celis, 2016). Es decir un clon resistente al dividirse probablemente diseminó la resistencia a quinolonas detectada, que se atribuye al uso de estos antibióticos en el agua como profilaxis post-destete (Celis, 2016).

Se identificó transferencia replicativa de plásmidos de los grupos de incompatibilidad *IncI1* portadores de los genes *bla*_{CMY-2} (figura 3) en tres cepas de *Escherichia coli* resistentes a las cefalosporinas de tercera generación ceftazidima, ceftriaxona y cefuroxima, que probablemente fueron seleccionados por el uso profiláctico de ceftiofur en la granja (Rubio, 2016).

Finalmente, se encontró evidencia de transposición replicativa de los genes de resistencia a aminoglicósidos *strA*, *strB* y *aph(3')-Ic* (figura 4), en dos cepas *E. coli* donde aparece movilización de genes de resistencia por la presencia de elementos genéticos que se sugiere son por el uso de antibióticos de este grupo en la granja para el tratamiento de enfermedades respiratorias (Celis, 2016).

La magnitud del gasto energético que impone la expresión de un gen de resistencia a la bacteria, aparece como el principal parámetro biológico que influye en su tasa de desarrollo, estabilidad y reversibilidad (Andersson & Hughes, 2010). La expresión de genes de resistencia, genera gasto energético adicional, el cual depende del tipo de resistencia expresada y puede disminuir la capacidad del microorganismo para sobrevivir y reproducirse (Marciano et al., 2007).

Genes de resistencia localizados a nivel cromosomal exigen mayor gasto energético, por esta razón, la expresión de algunos genes puede ser inducida por un estímulo en particular; este es el caso de la resistencia a vancomicina en *S. aureus*, la cual es inducida sólo en respuesta a la presencia de glicopéptidos (Moubareck, et al., 2009), o los genes pueden ser movilizados a plataformas extracromosomales (Andersson & Hughes,

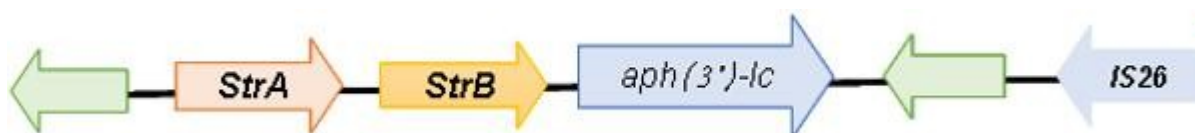


Figura 4. Mapa genético de la región de resistencia a aminoglicósidos *StrA-StrB-aph(3')-Ic* flanqueado corriente abajo por la secuencia de inserción IS26.

2010), disminuyendo el gasto energético porque pueden autoreplicarse independientemente sin división celular. En contraste, los genes de resistencia a antibióticos localizados en plataformas móviles de DNA extracromosomal, generan menor gasto energético, por lo que tienden a mantenerse y expresarse por más tiempo (Enne *et al.*, 2005).

De otro lado el fenómeno de co-selección representaría bajo costo energético y por tanto preserva la resistencia. Éste se define como la adquisición y conservación de diferentes genes de resistencia localizados en la misma plataforma, característica común en la resistencia adquirida por transferencia horizontal (Cantón & Ruiz-Garbajosa, 2011), constituyéndose en uno de los principales problemas de multiresistencia. Así, el tiempo requerido para reducir la expresión de resistencia a un antibiótico está inversamente relacionado con el costo biológico generado (Andersson & Hughes, 2010).

Conclusiones

La comprensión sobre las bases teóricas de la evolución bacteriana y resistencia a antibióticos ha estado cruzada por discusiones sobre organismo, gen, herencia y las dos teorías centrales de la evolución en donde resultados a partir de estudios morfológicos, bioquímicos y genéticos en bacterias han sido usados como argumentos a favor de una o de otra. Hoy sabemos que la expresión diferencial de algunas enzimas, que a su vez depende del condicionamiento ambiental, está bajo control genético. Así mismo, se dan mutaciones al azar cuya probabilidad de aparición aumenta ante presión ambiental y se transfieren genes extracromosomales que obedecen dinámicas azarosas sintetizando las dos teorías en la comprensión de la fisiología bacteriana y de la resistencia a antimicrobianos, señalando la importancia del ambiente en el proceso evolutivo bacteriano

y la necesidad de monitorearlo ante exposición a antibióticos para entender las dinámicas de diseminación de microorganismos resistentes, la transferencia de elementos genéticos involucrados, la presión antibiótica en la diseminación y aparición de este fenómeno de importancia en salud pública por su costo económico, social y ambiental.

Agradecimientos

A Colciencias, proyecto 110165841813, Programa Nacional de Ciencias básicas, al Programa de apoyo estudiantes de posgrado, UN, Jóvenes investigadores, a la Universidad Nacional de Colombia.

Referencias bibliográficas

- Amsterdamska, O. (1987). Medical and biological constraints: early research on variation in bacteriology. *Social Studies of Science*, 17(4), 657-687. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11612359>.
- Amsterdamska, O. (1991). Stabilizing instability: the controversy over cyclogenetic theories of bacterial variation during the interwar period. *Journal of the history of biology*, 24(2), 191-222. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11612552>.
- Amsterdamska, O. (1993). From Pneumonia to DNA : The Research Career of Oswald T. Avery. *Historical Studies in the Physical and Biological Sciences*, 24(1), 1-40. Recuperado a partir de <http://www.jstor.org/stable/10.2307/27757711>.
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology*, 8(4), 260-271. Recuperado a partir de <http://doi.org/10.1038/nrmicro2319>.

- Arkwright, J. A. (1921). Variation in bacteria in relation to agglutination both by salts and by specific serum. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 24(1), 36-60. Recuperado a partir de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.1700240104/abstract>.
- Avery, O., MacLeod, C., & McCarty, M. (1943). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types. *Resonance*, 79(6), 137-158. Recuperado a partir de <http://www.springerlink.com/index/g345284417660444.pdf>.
- Barnett, J. A. (2004). A history of research on yeasts 7: enzymic adaptation and regulation. *Yeast*, 21(9), 703-746. Recuperado a partir de <http://doi.org/10.1002/yea.1113>.
- Burnet, F.M. (1927). The Bacteriophage and its Behaviour. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 21(3), 243-244. [http://doi.org/10.1016/S0035-9203\(27\)90013-3](http://doi.org/10.1016/S0035-9203(27)90013-3).
- Cantón, R., & Ruiz-Garbajosa, P. (2011). Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Current Opinion in Pharmacology*, 11(5), 477-485. Recuperado a partir de [http://doi.org/S1471-4892\(11\)00129-9](http://doi.org/S1471-4892(11)00129-9) [pii]10.1016/j.coph.2011.07.007.
- Celis, Y. A. (2016). Resistencia a antibióticos en *E. coli* y *S. aureus* aislados de fuentes animales, y ambientales. (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá)
- Choffnes, E. R., Relman, D. A., Mack, A. (2010). Antibiotic Resistance: Implications for Global Health and Novel Intervention Strategies. Washington DC: *National Academies Press*.
- Cohen, S. N. (1993). Bacterial plasmids: their extraordinary contribution to molecular genetics. *Gene*, 135(1-2), 67-76. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8276280>
- Cole, L., & Wright, W. (1916). Application of the Pure-Line Concept to Bacteria. *Journal of Infectious Diseases*, 19(2), 209-221. Recuperado a partir de <http://jid.oxfordjournals.org/content/19/2/209.full.pdf>.
- Courvalin, P. (2008). Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *J Internal Medicine*, 264(1), 4-16. Recuperado a partir de <http://doi.org/JIM1940> [pii]10.1111/j.1365-2796.2008.01940.x.
- Creager, A. N. H. (2007). Adaptation or selection? Old issues and new stakes in the postwar debates over bacterial drug resistance. *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 38(1), 159-90. Recuperado a partir de <http://doi.org/10.1016/j.shpsc.2006.06.016>.
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433. Recuperado a partir de <http://doi.org/74/3/417> [pii]10.1128/MMBR.00016-10.
- Davis, B. (1950). Nonfiltrability of the agents of genetic recombination in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 60(4), 507-508. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC385908/>.
- Demerec, M. (1945). Production of *Staphylococcus* strains resistant to various concentrations of penicillin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 31(1), 16-24. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1078743/>.
- Demerec, M. (1948). Origin of Bacterial Resistance to Antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 56(1), 63-74.
- Denamur, E., Lecointre, G., Darlu, P., Tenaillon, O., Acquaviva, C., Sayada, C., Radman, M. (2000). Evolutionary implications of the frequent horizontal transfer of mismatch repair genes. *Cell*, 103(5), 711-721. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11114328>.
- Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E., & Courvalin, P. (2007). Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1), 79-114. Recuperado a partir de <http://doi.org/10.1128/CMR.00015-06>.
- Dienert, F. (1900). Sur la fermentation du galactose et sur l'accoutumance des levures à ce sucre. *Annales de l'Institut Pasteur, Paris*, 14, 139-189.
- Enne, V. I., Delsol, A. A., Davis, G. R., Hayward, S. L., Roe, J. M., & Bennett, P. M. (2005). Assessment of the fitness impacts on *Escherichia coli* of acquisition of antibiotic resistance genes encoded by different types of genetic element. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(3), 544-551. Recuperado a partir de <http://doi.org/dki255> [pii]10.1093/jac/dki255.
- Fildes, P., & Whitaker, K. (1948). Training or mutation of bacte-

- ria. *British Journal of Experimental Pathology*, 29(3), 240-8. Recuperado a partir de <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2074242&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Gillings, M. R., Paulsen, I. T., & Tetu, S. G. (2015). Ecology and Evolution of the Human Microbiota: Fire, Farming and Antibiotics, *Genes*, 6(3), 841-857. Recuperado a partir de <http://doi.org/10.3390/genes6030841>.
- Hadley, P. (1927). Microbic Dissociation/: The Instability of Bacterial Species with Special Reference to Active Dissociation and Transmissible Autolysis. *The Journal of Infectious Diseases*, 40(1), 1-312. Recuperado a partir de <http://www.jstor.org/stable/30083414%5Cnpapers2://publication/uuid/8845D247-63F7-4675-AEDA-D530CBA12CFE>.
- Hayes, W. (1952). Recombination in Bact. coil K 12: Unidirectional Transfer of Genetic Material, *Nature*, 169(4290), 118-119. Recuperado a partir de <http://www.nature.com/nature/journal/v169/n4290/abs/169118b0.html>.
- Jacob, F. (1960). "L'operon: a group of genes with the expression coordinated by an operator]. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, 250, 1727-9. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14406329>.
- Jacob, F., Perrin, D., Sánchez, C., Monod, J., & Edelstein, S. (2005). [The operon: a group of genes with expression coordinated by an operator. C.R.Acad. Sci. Paris 250 (1960) 1727-1729]. *Comptes rendus biologies*, 328(6), 514-20. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15999435>.
- Keen, P. L., & Montforts, M. H. M. M. (2012). *Antimicrobial resistance in the environment*. John Wiley & Sons. Hoboken, N.J.
- Kohanski, M. A., DePristo, M. A., & Collins, J. J. (2010). Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Molecular Cell*, 37(3), 311-320. Recuperado a partir de <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.003>.
- Kohler, R. (1985). Innovation in normal science: Bacterial physiology. *Isis*, 76(2), 162-181. Recuperado a partir de <http://www.jstor.org/stable/10.2307/231745>.
- Koonin, E. V., & Wolf, Y. I. (2009). Is evolution Darwinian or/and Lamarckian? *Biology Direct*, 4(1), 42. Recuperado a partir de <http://doi.org/10.1186/1745-6150-4-42>.
- Lederberg, J. (1947). Gene Recombination and Linked Segregations in *Escherichia coli*. *Genetics*, 32(5), 505-525.
- Lederberg, J. (1952). Cell genetics and hereditary symbiosis. *Physiological reviews*, 32(4), 403-430. Recuperado a partir de <http://profiles.nlm.nih.gov/ps/access/bbabfo.pdf>.
- Lederberg, J. (1998). Plasmid (1952-1997). *Plasmid*, 39 (1), 1-9. <http://doi.org/10.1006/plas.1997.1320>
- Lederberg, J. (2000). Infectious history. *Science*, 288 (5464), 287-293. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10777411>.
- Lederberg, J., & Lederberg, E. M. (1952). Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *Journal of Bacteriology*, 63(3), 399-406.
- Levy, S. B. (2005). Antibiotic resistance-the problem intensifies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1446-1450. Recuperado a partir de [http://doi.org/S0169-409X\(05\)00097-9](http://doi.org/S0169-409X(05)00097-9) [pii]10.1016/j.addr.2005.04.001.
- Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10, S122-S129. Recuperado a partir de <http://doi.org/10.1038/nm1145>.
- Luria, S. E., & Delbrück, M. (1943). Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, 28(6), 491-511. Recuperado a partir de <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1209226&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Marciano, D. C., Karkouti, O. Y., & Palzkill, T. (2007). A fitness cost associated with the antibiotic resistance enzyme SME-1 beta-lactamase. *Genetics*, 176(4), 2381-2392. Recuperado a partir de <http://doi.org/10.1534/genetics.106.069443>.
- Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 718-733. Recuperado a partir de <http://doi.org/10.1128/CMR.00002-11>.
- Martinez, J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, 157(11), 2893-2902. [http://doi.org/S0269-7491\(09\)00294-2](http://doi.org/S0269-7491(09)00294-2) [pii]10.1016/j.envpol.2009.05.051.
- Monod, J. (1956). Remarks on the mechanism of enzy-

- me induction. In O. H. Gaebler (Ed.), *Enzymes: Units of biological structure and function* (pp. 7–28). New York: Academic Press.
- Moubareck, C., Meziane-Cherif, D., Courvalin, P., & Périchon, B. (2009). VanA-type *Staphylococcus aureus* strain VRSA-7 is partially dependent on vancomycin for growth. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 53(9), 3657-3663. [http://doi.org/AAC.00338-09](http://doi.org/AAC.00338-09[pii]10.1128/AAC.00338-09)
- Pál, C., Papp, B., Lercher, M. J., & Pal, C. (2005). Adaptive evolution of bacterial metabolic networks by horizontal gene transfer. *Nature Genetics*, 37(12), 1372-5. Recuperado a partir de <http://doi.org/10.1038/ng1686>.
- Rosselló-Mora, R. (2003). Opinion: the species problem, can we achieve a universal concept? *Systematic and Applied Microbiology*, 26(3), 323-326. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14529174>.
- Rosselló-Mora, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(1), 39-67. Recuperado a partir de [http://doi.org/S0168-6445\(00\)00040-1](http://doi.org/S0168-6445(00)00040-1).
- Rubio, V. V. (2016). *Caracterización fenotípica y molecular de microorganismos aislados de animales en una granja porcícola*. (Magister dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá).
- Stephenson, M., & Gale, E. (1937). The adaptability of glucozymase and galactozymase in *Bacterium coli*. *Biochemical Journal*, 31(8), 1311-1315. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1267078/>.
- Stephenson, M., & Yudkin, J. (1936). Galactozymase considered as an adaptive enzyme. *The Biochemical Journal*, 30(3), 506-514. Recuperado a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1263051/>.
- Stokes, H. W., & Gillings, M. R. (2011). Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 790-819. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x>.
- Sykes, R. (2010). The 2009 Garrod lecture: the evolution of antimicrobial resistance: a Darwinian perspective. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(9), 1842-52. Recuperado a partir de <http://doi.org/10.1093/jac/dkq217>.
- Tatum, E. L., & Lederberg, J. (1947). Gene recombination in the bacterium *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 53(6), 673-84. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20251256>.
- Watanabe, T. (1963). Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriological Reviews*, 27(1), 87-115. Recuperado a partir de <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?atid=441171&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Yudkin, J. (1936). Enzyme Variation in Microorganisms. *Biological Reviews*, (October). Recuperado a partir de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-185X.1938.tb00508.x/abstract>.