

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN BACTERIAS HETERÓTROFAS PROCEDENTES DE "BAHÍA DE LA HABANA".**

**TITLE: BIOLOGICAL ACTIVITIES IN HETEROTROPHIC BACTERIA FROM "BAHÍA DE LA HABANA".**

**AUTORES:** E. Ortiz, M. Morales, Y. Cartaya, A. Miranda, E. Fonseca, K. Paneque, V. Caballero, C. Martínez y Y. Díaz.

**DIRECCIÓN:** Centro de Bioproductos Marinos (CEBIMAR), AMA, CITMA, Loma e/ 35 y 37, Alturas del Vedado, Ciudad de La Habana, C.P. 10 600, CUBA, Teléfono: 881 1298, 881 9300. E mail: [cebimar@ama.cu](mailto:cebimar@ama.cu) y [cebimar@infomed.sld.cu](mailto:cebimar@infomed.sld.cu) En Tramitación

Revista CIM

**TITULO CONDENSADO:** *Bioactividad de bacterias heterótrofas.*

**CONDENSED TITLE:** Bioactivities In Heterotrophic Bacteria

**RESUMEN:** En el presente trabajo se evaluó la actividad biológica de 87 aislamientos de bacterias heterótrofas procedentes de la "Bahía de La Habana". El espectro de potencialidades mostró que el 29,9% de los mismos presentó actividad antimicrobiana frente a las cepas indicadoras empleadas. Un 63,2% presentó actividad caseinasa, el 44,8% mostró su actividad hemolítica y el 83,4% fue capaz de excretar compuestos con actividad superficial. Respecto a los mecanismos degradativos, el 57,5% de ellas, mostró preferencia por el petróleo como fuente de carbono y el 42,5% por los compuestos organoclorados. Se evidenció la amplia gama de actividades con

aplicación biotecnológica que poseen las bacterias heterótrofas aisladas de éste ecosistema altamente impactado.

**ABSTRACT:** In this paper we studied the biological activities on 87 heterotrophic bacteria isolated from "Bahía de La Habana". Their behavior showed that 29,9% had antimicrobial activity versus the indicator strains selected. Caseinase activity was present in 63,2% of the strains, haemolytic activity was detected in the 44,8% ones, whilst 83,4% were able to produce surfactants. Taking in account degradative mechanisms, 57,5% were oil degrading isolates and 42,5% preferred organic chlorinated compounds as carbon source. We found that the heterotrophic bacteria isolated from this highly impacted ecosystem had a broad spectrum of potentialities with several practical applications.

## **INTRODUCCIÓN**

La búsqueda de bacterias productoras de sustancias de interés biotecnológico data de hace más de 50 años, cuando se descubrió que algunas especies bajo determinadas condiciones, eran capaces de producir diferentes sustancias que bien podían ser enzimas, proteínas, antimicrobianos o sencillamente tenían la capacidad de degradar compuestos químicos de composición compleja. El estudio de estas bacterias en diferentes ecosistemas ha sido motivo de interés para el desarrollo de un sin número de investigaciones con el fin de crear nuevos productos derivados de las mismas (Berdy *et al.*, 1989).

Así mismo, en los últimos años se han producido a partir de microorganismos entre 30 000 y 50 000 tipos de productos naturales, más de 10 000 de ellos son biológicamente activos y cerca de 8 000 son antibióticos y antitumorales los cuales cuentan con un importante uso en la medicina (Betina, 1983).

En los últimos años se ha hecho evidente la creciente resistencia de los microorganismos causantes de enfermedades infecciosas a los antibióticos comerciales comúnmente empleados, lo que impone la búsqueda de nuevos antimicrobianos y con ello la exploración de ambientes tradicionalmente no explotados para tales fines, como es precisamente el medio marino (Blunt *et al.*, 2003). Por otra parte se reconoce que en el medio marino existe un enorme arsenal, de nuevas moléculas que pudieran ser útiles para diferentes esferas de la actividad humana (Fenical y Jensen, 1996).

Según los antecedentes y tomando en consideración la notable diversidad microbiana encontrada en las aguas y sedimentos de la Bahía de La Habana, se decidió el estudio de algunas potencialidades a las cepas de bacterias aisladas.

## **MATERIALES Y METODOS**

La evaluación de la actividad biológica de los aislamientos procedentes de Bahía de La Habana fue realizada a partir del banco de trabajo constituido por las cepas ya caracterizadas. Las potencialidades biotecnológicas consideradas fueron las actividades antimicrobiana, proteolítica (actividad caseinasa) y hemolítica, producción de tensioactivos y la degradación de petróleo y de compuestos organoclorados.

**Actividad antimicrobiana:** La producción de sustancias antimicrobianas por parte de las bacterias aisladas se realizó con el empleo de cuatro cepas de referencia que incluyeron a *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Se trabajó aplicando la metodología establecida para la evaluación de la actividad antimicrobiana, descrita en el PNO 5.88/2005 del Dpto. Microbiología Aplicada.

**Actividad proteolítica: hidrólisis de la caseína:** Se trabajó con el método descrito por Cowan-Steel's (1993) para la preparación y evaluación de la actividad con el medio agar leche, empleándose como control positivo de la misma a *Bacillus subtilis* y como control negativo el medio estéril sin inocular.

**Actividad hemolítica:** Para la preparación y evaluación en el medio agar sangre, se consideró como control positivo de la calidad del medio y de la actividad a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y como control negativo el medio sin inocular, se trabajó según lo descrito en el PNO 5.94/2005 del Dpto. Microbiología Aplicada.

**Producción de tensioactivos:** La producción de tensioactivos se evaluó en cultivos fermentados libres de células siguiendo el método de Ortiz (2004) para la centrifugación, cultivo y determinaciones.

**Degradación de petróleo y compuestos organoclorados:** Petróleo: Se realizó utilizando el medio Vela y Ralston (1978) agarizado y como fuente de carbono el petróleo Varadero de 11 API. Para la evaluación del crecimiento se siguió la metodología de Joseph (1996).

Organoclorados: Se empleó el medio salino para la degradación de fenoles (Vela y Ralston, 1978). La selección de bacterias degradadoras de compuestos fenólicos se realizó por el método de replica en placa (Ortiz *et al.*, 2002), con el medio de cultivo agarizado siguiendo la metodología descrita por Rivero, (2005).

## RESULTADOS

**Actividad antimicrobiana:** De los 87 aislamientos evaluados procedentes de la Bahía de La Habana, 26 para un 29,9 % inhibieron el crecimiento de al menos una de las cepas reveladoras empleadas, mientras que el resto de las cepas (61 para un 70,1 %) no presentó actividad antimicrobiana. Los aislamientos que mostraron dicha actividad se comportaron del siguiente modo: 16 cepas positivas frente a *E. coli*, 8 cepas positivas frente a *B. subtilis*, 8 cepas positivas frente a *S. aureus* y una cepa positiva frente a *P. aeruginosa*, como muestra la Figura 1.

En términos generales el porcentaje de bacterias marinas que presentó actividad antimicrobiana logró inhibir tanto a los controles Gram negativos (*E. coli* y *P. aeruginosa*) como a los Gram positivos (*B. subtilis* y *S. aureus*). En particular se detectó que cuatro de los cultivos evaluados (CBM-403, CBM-559, CBM-568 y CBM-610) inhibieron el crecimiento de dos cepas indicadoras, mientras que las cepas CBM-582 y CBM-633 presentaron actividad frente a *B. subtilis*, *E. coli* y *S. aureus*.

*P. aeruginosa* mostró una gran resistencia ante los compuestos excretados por los microorganismos procedentes de la Bahía de la Habana, solo fue inhibida por la acción de la cepa CBM-586.

**Actividad proteolítica: hidrólisis de la caseína:** El resultado de este ensayo arrojó que 55 de las cepas presentó actividad caseinasa, para un 63,2 % (Figura 2); de las cuales 44 corresponden al grupo de las Gram positivas, mientras que solo 7 ejemplares de las Gram negativas produjeron esta enzima (Tabla I). Las potencialidades de las bacterias marinas como productoras de metabolitos son notables. El estudio de esta bioactividad arrojó que más del 60% de las cepas fueron capaces de excretar enzimas de éste tipo.

**Actividad hemolítica:** La determinación de la actividad hemolítica arrojó que 39 aislamientos para un 44,8% del total presentaron esta propiedad (Figura 3). La misma se relaciona con la ruptura de los eritrocitos y consecuente liberación de las moléculas de hemoglobina, lo que ocurre debido a la acción de exotoxinas que se separan con facilidad de la pared celular, de composición proteica, con actividad enzimática y tóxica para la célula hospedera.

Al igual que *S. aureus*, microorganismo patrón respecto a dicho comportamiento, diferentes especies de géneros como *Bacillus*, pueden reaccionar de modo similar (Frobisher, 1969). Durante la determinación de cepas con actividad hemolítica se detectó que 30 de los 39 aislados con esta propiedad, fueron bacterias Gram positivas lo cual pone de manifiesto una predominancia de este grupo sobre las Gram negativas que concluyeron en un total de 9 cepas (Tabla I).

**Producción de tensioactivos:** A partir de los 87 aislamientos logrados se detectó que 73, para un 83,9%, produjeron compuestos con actividad superficial exocelular a partir

de sustratos hidrosolubles como la sacarosa (Figura 4). El 10,9% de estas cepas produjo tensioactivos que disminuyeron significativamente los valores de tensión superficial ( $<35\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) con respecto al control ( $45,7\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) y el 20,7% fue capaz de producir tensioactivos que disminuyeron la tensión superficial a valores inferiores de  $30\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  con respecto al control.

**Degradación de petróleo y compuestos organoclorados:** Los resultados de este ensayo demostraron que un gran porcentaje de las bacterias evaluadas fueron capaces de utilizar el petróleo (57,4%) o compuestos organoclorados (42,5%) como única fuente de carbono y energía (Figura 5). Debe destacarse que del total de cepas degradadoras de estos compuestos 21 presentaron la capacidad de utilizar ambos sustratos como única fuente de carbono y energía. En este grupo se incluyeron cepas de ambas matrices de aislamiento, encontrando que 16 cultivos provenían de los sedimentos, mientras que solo 5 correspondían a muestras de agua.

## DISCUSIÓN

**Antimicrobianos:** La escasa actividad antimicrobiana por parte de los aislamientos marinos realizados, fue sugerida por Fábregas *et al.*, (1991). La respuesta baja por parte de los cultivos frente a *P. aeruginosa* pudiera atribuirse a que ésta presenta fuertes mecanismos de defensa como son la presencia de  $\beta$ - lactamasas, alteraciones en la permeabilidad de la membrana dadas por la presencia de bombas de expulsión y mutaciones de las porinas transmembranales, que le confieren un amplio grado de resistencia a un elevado número de antibióticos y a otras sustancias antimicrobianas. Por otra parte, los estudios de producción de sustancias inhibitorias por parte de

bacterias marinas mostraron que solo el 3% produjo inhibición contra *P. aeruginosa* (Lodeiros *et al.*, 1989).

La mayor actividad observada sobre *E. coli* pudo estar determinada por la sensibilidad que la misma presenta frente a una amplia gama de antibióticos, pudiendo presumirse que algunos de ellos fueron capaces de producir una sustancia que limitó o inhibió su crecimiento. Los resultados de la actividad antimicrobiana pueden considerarse satisfactorios al compararlos con lo obtenido por Rosenfeld y Zobell (1947) que en un total de 58 aislamientos bacterianos de origen marino, solo el 15% presentó actividad antimicrobiana (19 cepas).

**Actividad proteolítica: hidrólisis de la caseína:** El resultado obtenido concuerda con lo planteado por Attaway y Zaborsky, (1993) respecto a la abundancia de bacterias proteolíticas en el medio marino, destacándose su presencia en los sedimentos anaerobios. Además, en estudios realizados con bacterias de las aguas oceánicas adyacentes a Cuba se demostró su elevada capacidad para exhibir la actividad proteolítica, ya que el 69,8 % fue capaz de hidrolizar la caseína (Lugioyo, 2003).

El empleo de proteasas de origen animal fue sustituido a causa de su labilidad, entrando en vigor la aplicación de aquellas de origen microbiano, debido a que éstos proliferan en medios con bajo costo. En la actualidad las bacterias productoras de proteasas pueden ser utilizadas en diferentes procesos como son la industria de los detergentes, alimentos, clarificación de cerveza y demás bebidas, ablandamiento de carnes rojas y en la industria del cuero (Schmidt, 1981).



**Hemólisis:** Ensayos anteriores realizados con bacterias de origen marino demostraron la capacidad de las mismas para producir hemolisinas. Un porcentaje similar al obtenido en este estudio fue encontrado por Lugioyo (2003), en aguas aledañas a las costas cubanas donde reportó que más del 50% de las cepas bacterianas presentaron tal actividad..

La búsqueda de microorganismos marinos con actividad hemolítica resulta de interés ya que permite encontrar nuevas hemolisinas de uso en la terapéutica para la eliminación selectiva de células indeseadas, como ya ha sido probado con otras citolisinas provenientes de organismos marinos (Lugioyo, 2003). Por otra parte la detección de esta bioactividad constituye un método de selección de microorganismos potencialmente productores de tensioactivos, ya que estos compuestos tienen la propiedad de lisar los glóbulos rojos (Mulligan *et al.*, 1989).

**Tensioactivos:** A pesar de que el mecanismo fisiológico de los biotensioactivos obtenidos a partir de sustratos hidrosolubles no ha sido esclarecido, se conoce una gran variedad de microorganismos productores en presencia de la sacarosa como fuente de carbono, el cual ha sido muy utilizado, por la simplicidad del proceso fermentativo y su fácil comercialización (Cooper y Goldenberg, 1987; Ortiz, 2004).

Resultados similares describe la literatura, en particular para especies de *Bacillus* se ha informado la producción de biotensioactivos a partir de diferentes fuentes de azúcares, entre las que se encuentran *B. brevis*, *B. cereus*, *B. licheniformis* y *B. subtilis* (Lugioyo *et al.*, 1996; Núñez *et al.*, 2001 y Ortiz, 2004). Los tensioactivos son utilizados como

formadores y estabilizadores de emulsiones, detergentes, solubilizadores, humectantes, espumantes y antiespumantes, por lo que son empleados en la industria petrolera, médico-farmacéutica y cosmética.

**Degradación de petróleo y compuestos organoclorados:** En el caso de los aislamientos evaluados procedentes de Bahía de La Habana, la existencia de hidrocarburos y otros contaminantes favoreció la proliferación de los mismos, debido a una adaptación genotípica a la degradación y/o biotransformación de compuestos xenobióticos (Miravet *et al.*, 2003). Se plantea que entre los mecanismos para la degradación del petróleo se involucran complejos enzimáticos controlados por genes ubicados en plásmidos. Este proceso ocurre de manera secuencial para cultivos axénicos que tienen la capacidad de realizar la mineralización de los hidrocarburos del petróleo hasta su completa oxidación en dióxido de carbono y agua (Cabranes, 2005).

De modo similar al proceso de degradación del petróleo, los compuestos organoclorados pueden ser atacados por bacterias y hongos siendo utilizados como única fuente de carbono para su crecimiento con liberación de cloro y dióxido de carbono, además de la formación de catecol o quinona, aunque todavía no se conocen con exactitud las enzimas participantes en este proceso (Rivero, 2005).

En general las bacterias heterótrofas aisladas de la Bahía de La Habana presentaron gran diversidad de potencialidades, aunque debe señalarse que su distribución de acuerdo a los grupos morfotintoriales no fue similar. Éste resultado coincide con lo planteado por Fenical (1993), quien considera a las bacterias marinas una fuente

inexplorada de metabolitos secundarios, muchos de ellos provenientes del grupo Gram positivo.

## CONCLUSIONES

- A través de las potencialidades evaluadas se mostró que el 29,9% de los aislamientos presentó actividad antimicrobiana frente a las cepas indicadoras empleadas, el 63,2% presentó actividad caseinasa, el 44,8% presentó actividad hemolítica y 83,4% fue capaz de excretar tensioactivos a partir de sustratos hidrosolubles.
- Además, en cuanto a la capacidad degradadora, el 57,5% de los aislamientos mostró su avidez frente al petróleo, mientras que el 42,5 % frente a los compuestos organoclorados.
- La respuesta positiva a las bioactividades evaluadas se relacionó directamente con el número de bacterias Gram positivas.
- Se demostró la amplia gama de actividades con aplicación biotecnológica que poseen las bacterias procedentes de la Bahía de La Habana.

## REFERENCIAS

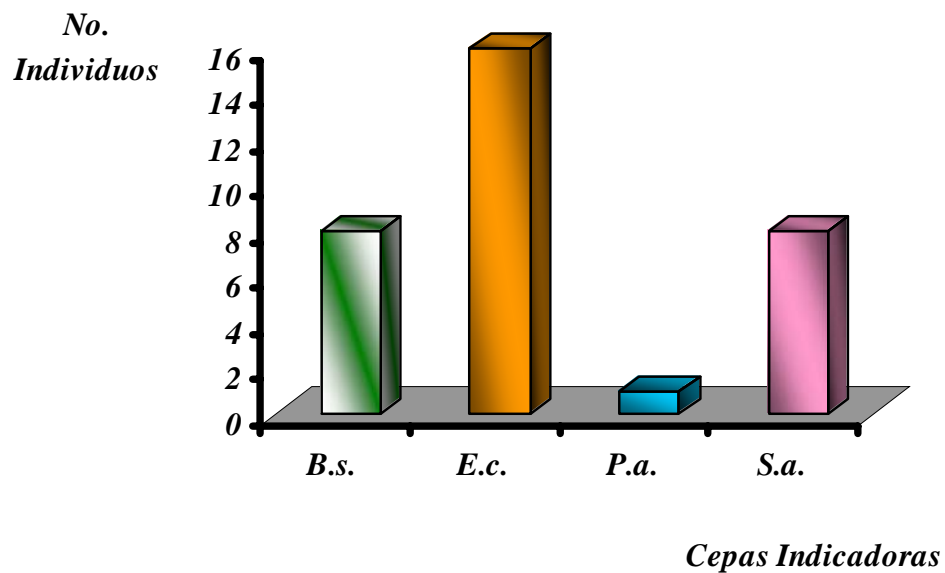
- Attaway, D. H. y O.R. Zarborsky (1993). Pharmaceutical and Bioactive Natural Products, In: Marine Biotechnology, Vol. 1, Ed. New York: Plenum, 500 pp.
- Banat, I., R. Makkar y S. Cameotra. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 495-508.
- Berdy, J; M.E. Busell y U. Grafe. (1989). Bioactive Metabolites from Microorganisms, Progress in Microbiology. Ed. Elsevier, Amsterdam vol. 27, pp 3-25.
- Betina, V. (1983). The Chemistry and Biology of Antibiotics, vol. 5. New York: Elsevier. 591 pp.

- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H., Northcote, P.T. y Prinsep, M.R. (2003). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 20(1):1-48.
- Cabranes, Y. (2005). *Cinética de degradación de hidrocarburos del petróleo por Bacillus alcalophilus cepa CBM-225*. Tesis presentada en opción al grado científico de Master in Sciences, Facultad de Biología, U.H., Ciudad de La Habana, Cuba.
- Cooper, D.G. y B.G. Goldenberg. (1987). Surface – active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(2): 224 – 229.
- *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. (1993) Third Edition, Edited by G. I. Barrow and R. K. A. Feltham. Pp.34-35 y 227-228.
- Fábregas, J., A. Muñoz, A. Otero, J.L. Barja y M. Romaris. (1991). A Preliminary Study on Antimicrobial Activity of Some Bacteria Isolated from Marine Environment. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57(7): 1377-1382.
- Fenical, W. (1993). *Chemical Studies on Marine Bacteria: Developing a New Resource*. Scripps Institution of Oceanography, University of California, San Diego, La Jolla, California.
- Fenical, W. y P.R. Jensen. (1996). *Marine Microorganisms: A New Biomedical Resource*. En: *Marine Biotechnology*, D.H. Attaway y O.R. Zaborsky (eds.). Plenum Press, New York. Pp. 419-455.
- Joseph, N. I. (1996). *Microorganismos marinos degradadores de hidrocarburos y sus aplicaciones en la industria petrolera*. Tesis presentada en opción al grado científico de Master in Sciences, Facultad de Biología, U.H., Ciudad de La Habana, Cuba.

- Lodeiros, C., A. Espín, Y. Ordaz y C. González (1989). Actividad antibiótica de bacterias marinas ante bacterias patógenas de humanos. *Microbiología Acta Científica Venezolana* 40: 610-617.
- Lugioyo, G.M.; M. Villaverde, J.M. González, T. García y F. Acosta. (1996). Producción de tensioactivos por *Bacillus cereus* IDO-503. *Rev. CNIC Ciencias Biológicas* vol. 27, No. 1, 2, 3: 78-82.
- Lugioyo, M. (2003): *Distribución, relaciones tróficas y diversidad del bacterioplancton de las aguas oceánicas de Cuba*. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas, Facultad de Biología, U.H., Ciudad de La Habana, Cuba, 140 p.
- Miravet, M., D. Enriquez, M. Lugioyo y Y. Delgado. (2003) Primeros reportes de hongos y bacterias heterótrofas aislados de los arrecifes de la plataforma SW de Cuba. *Revista electrónica Serie Oceanológica, Instituto de Oceanología*
- Mulligan, C.N., R.N. Yong and B.F. Gibbs. (2001). Surfactant-enhanced evaluation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*. 60, 371-380.
- Núñez R. (2003). *Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la biorremediación de derrames de hidrocarburos*. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas, Facultad de Biología, U.H., Ciudad de La Habana, Cuba, 253 pág.
- Núñez, R., M. Villaverde, E. Ortiz, V. Almazán, J. Castro y Y. Díaz. (2001). Estudios taxonómicos y nutricionales de una bacteria marina productora de tensioactivos. *Revista Biología UH* 15:57-63.

- Ortiz, E. (2004) .*Obtención y caracterización de un biotensioactivo a partir de Bacillus licheniformis IDO-60*. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas, Facultad de Biología, U.H., Ciudad de La Habana, Cuba, 226 pág.
- Ortiz, E., M. Morales, L. Graña, D. Enríquez, R. Núñez, R. Núñez, L. Coya, S. Sánchez, S. Fundora, E. Fonseca, R. Pizarro, C. Martínez, Y. Díaz, L. González. (2002). Informe Final del Proyecto “Colección de microorganismos marinos del Instituto de Oceanología”. Presentado ante el Comité de Expertos del Programa “Sistemática y Colecciones Biológicas, su Conservación, Mantenimiento y Exhibición”, Agencia de Medio Ambiente, CITMA, Ciudad de la Habana, Cuba.
- Rivero, A. (2005). *Selección de bacterias aisladas de ecosistemas marinos con capacidad para degradar fenoles*. Trabajo de Diploma, Facultad de Biología, U.H.
- Rosenfeld, D.W. and C.E. ZoBell. (1947). Antibiotic production by marine microorganisms. *Journal of Bacteriology* 54: 393-398.
- Schmidt, H. (1981). *Avances en Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. Alfabeto Impresora, Santiago de Chile.
- Vela, G.R. y H.J. Ralston. (1978). The effect of temperature on phenol degradation in waste water. *Can. J. Microb.* 24(11): 366-370.

## FIGURAS



*B.s. Bacillus subtilis*

*E.c. Escherichia coli*

*P.a. Pseudomonas aeruginosa*

*S.a. Staphylococcus aureus*

Figura 1. Número de aislados de Bahía de La Habana que presentaron actividad inhibitoria frente a las cepas utilizadas como indicadores en el ensayo de actividad antimicrobiana.

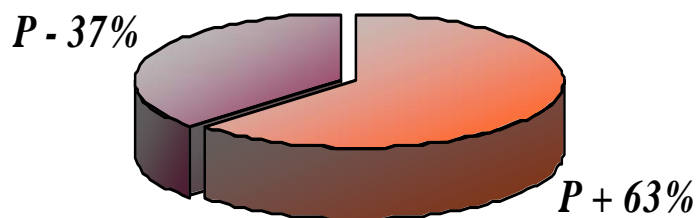


Figura 2. Actividad proteolítica presente en los aislamientos realizados.

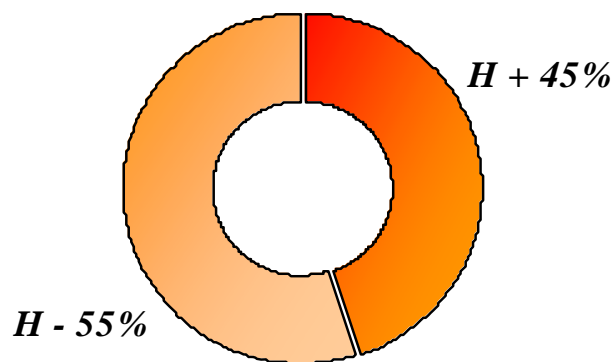


Fig. 3 Actividad hemolítica en las bacterias heterótrofas aisladas.



Tabla I. Distribución morfotintorial de los aislados que presentaron una respuesta positiva frente a cada una de las actividades evaluadas.

BIOACTIVIDADES	NO. CEPAS	GRAM POSITIVAS	GRAM NEGATIVAS
Antimicrobianos	26	19	7
Proteólisis	55	44	11
Hemólisis	39	30	9
Producción de tensioactivos	73	55	18
Degradación de xenobióticos	80	51	29

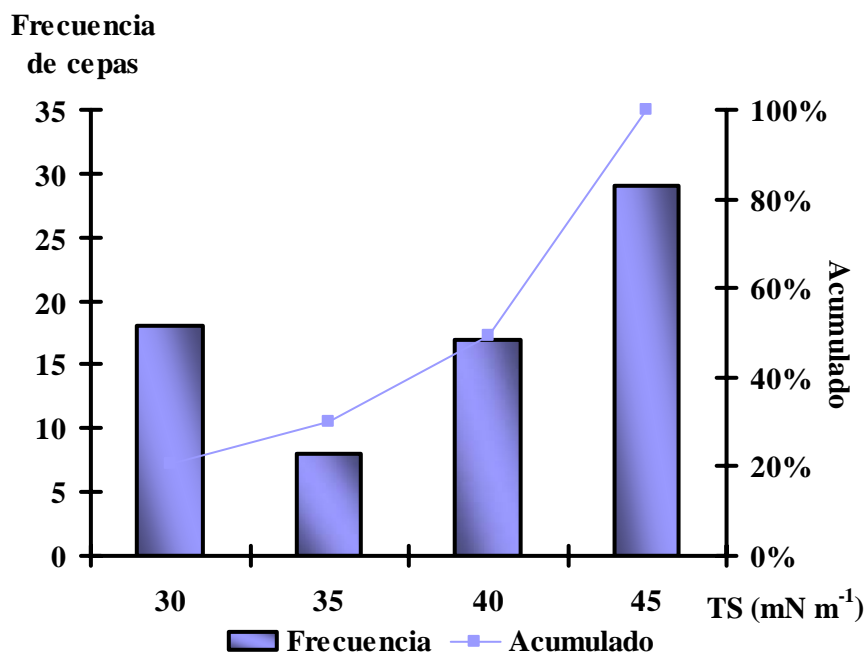


Figura 4 Distribución de las bacterias evaluadas según los rangos de clase para los valores de tensión superficial en sacarosa luego de 24 h de cultivo zaranda orbital a 125 r·min<sup>-1</sup> y 30 °C.

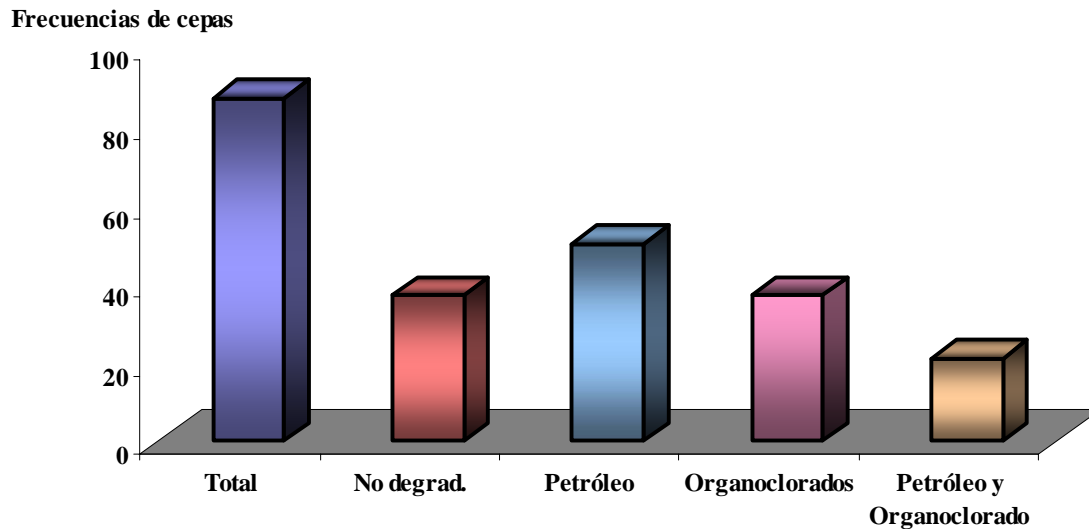


Figura 5. Distribución de las bacterias heterótrofas aisladas de la Bahía de La Habana por su capacidad de degradar compuestos recalcitrantes.

**DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA Y CORREO ELECTRÓNICO DEL AUTOR  
CORRESPONDIENTE**

Margarita Morales Barranco, Colección de Bacterias Marinas (Dpto. Microbiología Aplicada), Centro de Bioproductos Marinos (CEBIMAR), AMA, CITMA, Loma e/ 35 y 37, Alturas del Vedado, Ciudad de La Habana, C.P. 10 600, CUBA. Teléfonos 881 1298 y 881 9300, E mail [cebimar@ama.cu](mailto:cebimar@ama.cu) y [cebimar@infomed.sld.cu](mailto:cebimar@infomed.sld.cu) Dirigir a Peggy