

El funcionamiento de la colección de bacterias marinas.

Performance un marine bacterial collection

Margarita Morales, Eudalys Ortiz, Valia Caballero y R. Núñez.

Centro de Bioproductos Marinos (CEBIMAR), AMA, CITMA, Loma y 37, Alturas del Vedado, C. Habana, CP 10600, CUBA, Tlf. 881 1298 y 881 9300, E mail cebimar@infomed.sld.cu y cebimar@ama.cu

RESUMEN:

La biodiversidad marina es extremadamente alta como consecuencia directa de la variabilidad en el ecosistema marino, los microorganismos aislados de ecosistemas marinos constituyen una fuente potencial de sustancias naturales novedosas de interés biotecnológico, en particular las bacterias son reconocidas como fuente generadoras de metabolitos secundarios. Los resultados de las investigaciones relacionadas con el aislamiento, conservación y caracterización de bacterias heterótrofas han permitido establecer Colección de Bacterias Marinas del Centro de Bioproductos Marinos con más de 400 cultivos con una mayor frecuencia de bacterias Gram positivas (79 %), aisladas fundamentalmente a partir de la columna de agua (61%). Además, se detectaron nuevos registros de bacterias heterótrofas en aguas territoriales, y se detectó la capacidad de producir compuestos de interés biotecnológico en el 93 % de los cultivos de la colección con aplicación en el saneamiento ambiental y la industria médico-farmacéutica.

Palabras Claves: COLECCIÓN DE BACTERIAS MARINAS, CONSERVACION, BIOACTIVIDADES.

Abstract:

Marine biodiversity is extremely high, a direct consequence of the extraordinary variability of marine ecosystems, the microorganisms from the sea have the capacity to produce new substances for the biotechnology field, in especial the marine bacteria because they produce secondary metabolites. The results of the studies, based on isolation, conservation and characterization of the heterotrophic marine bacteria, were carried out during 20 years thus, establishing the Collection of Marine Bacteria of CEBIMAR. In this collection are more than 400 cultures with 79 % Gram positive bacteria from the columns of sea water (61%). On the other hand, there were reported new species of heterotrophic bacteria for Cuban waters and there were showed the potentiality to produce new compounds of biotechnological interest in 93% of the whole studied cultures that could be applied on environmental cleansing and medical-pharmaceutical industries.

Key Words: MARINE BACTERIAL COLLECTION, PRESERVATION, BIOACTIVITIES.

El impacto de la actividad antropogénica en el planeta constituye un factor de riesgo para la conservación de la diversidad biológica, donde la explotación indiscriminada de los recursos han provocado la pérdida de diversos ecosistemas y la desaparición de innumerables especies, probablemente totalmente desconocidas. En particular los microorganismos incluyen un mayor número de especies en peligro que otros grupos biológicos, teniendo en cuenta que existen evidencias de una gran cantidad de microorganismos viables aún no cultivados (Giovanonni y Rappé, 2000).

Los mares y océanos constituyen un enorme reservorio natural que justifica el desarrollo de investigaciones relacionadas con el incremento del conocimiento de su diversidad biológica,

en las que se incluyen la evaluación de sus potencialidades de uso. En la actualidad la gran mayoría de los microorganismos marinos, permanecen sin identificación, a pesar de que constituyen una parte importante de los recursos biológicos del planeta (Giovanonni, 2002). Los ecosistemas marinos constituyen una fuente poco explotada y de enormes perspectivas para la búsqueda de nuevos compuestos de interés, teniendo en cuenta su extensión, diversidad y condiciones de estrés totalmente diferentes a las existentes en los ambientes terrestres (Madigan, Martinko y Parker, 2003).

Entre los aspectos que estudia la Microbiología Marina se encuentra el conocimiento de la distribución, abundancia y actividad metabólica de las bacterias heterótrofas que contribuyen al reciclaje de los elementos biogénicos de los mares y océanos. Las bacterias heterótrofas constituyen uno de los grupos más importantes en el funcionamiento de los ecosistemas, ya que son capaces de degradar o mineralizar la materia orgánica presente en el medio, transfiriendo energía hacia los otros niveles tróficos (Kirchman, 2000). Su mayor o menor abundancia constituye un elemento orientador de la cantidad de materia orgánica presente capaz de ser oxidada por la actividad bacteriana (Lugioyo, 2003). Este grupo en particular, ha sido insuficientemente estudiado a pesar de que se reconoce el papel fundamental que juegan en los ecosistemas y de constituir una fuente de amplia biodiversidad.

El estudio y explotación de los recursos microbianos es realizado a través de la conservación en colecciones "ex-situ" que garantizan el mantenimiento y accesibilidad de cultivos puros, viables, y con estabilidad genética (Borem, Santos y Bowen, 2003). Estas colecciones son consideradas como centros de recursos biológicos (bancos de germoplasma) y constituyen fuentes para las investigaciones biotecnológicas y el desarrollo de bioproductos. Entre sus funciones principales se encuentran el depósito, la conservación y distribución de cultivos que serán empleados con fines docentes, industriales o investigativos. La adecuación de las buenas prácticas de laboratorio a las condiciones de trabajo propias de cada colección microbiana permitirá la mantención de la pureza, viabilidad y estabilidad genética de los cultivos que custodian (Smith, 2003).

La existencia de estas colecciones surge por la necesidad de ampliar el conocimiento de la diversidad microbiana, que aún es incipiente, así como la incorporación y conservación de grupos microbianos con potencialidades biotecnológicas. De esta manera, la identificación y caracterización de las potencialidades de los cultivos en colección requiere el aseguramiento de la autenticidad de los cultivos con el establecimiento de métodos de mantenimiento y conservación que garanticen el uso sostenible de los recursos genéticos disponibles (Madigan *et al.*, 2003).

Desde finales de 1989, el Instituto de Oceanología comenzó a establecer una Colección de Bacterias Marinas a partir de los aislamientos realizados en aguas y sedimentos marinos de Cuba, procedentes de los estudios ecológicos desarrollados desde principios de los años 80 del siglo XX. Actualmente la colección de bacterias se encuentra en el Centro de Bioproductos Marinos (CEBIMAR); donde se realizan diversas investigaciones dirigidas a ampliar el conocimiento de la diversidad microbiana marina en aguas territoriales.

En particular, las investigaciones están relacionadas con el incremento de las colecciones, abordando estudios para su clasificación taxonómica y conservación como garantía de su estabilidad genética. Además, se realiza la evaluación de diferentes potencialidades biotecnológicas, para ampliar el conocimiento sobre su diversidad química y farmacológica, lo cual ha permitido la interacción y desarrollo de nuevos proyectos enfocados hacia el empleo sostenible de los recursos marinos en la obtención de bioproductos de interés para la industria y el medio ambiente.

Los estudios relacionados con la determinación de la concentración y el aislamiento de bacterias heterótrofas a partir de muestras de origen marino establecen una estrecha relación con las características tróficas de las áreas de muestreo. Así mismo las cifras más elevadas de microorganismos suelen encontrarse en la zona más superficial, disminuyendo, en mayor o

menor cantidad, al aumentar la profundidad, aunque en la interfase agua-sedimento se observa un incremento por la se acumulación de una mayor cantidad de materia orgánica. Además, también se han detectado en regiones de afloramiento y en zonas de convergencia de aguas de diferentes orígenes (Miravet, 2003).

En general, este comportamiento se corresponde con lo encontrado en los estudios de sobre microbiología marina en aguas cubanas (Lugioyo, 2003; Miravet 2003). Sin embargo, la frecuencia de las bacterias heterótrofas encontradas es inferior a la referida por Giovannoni, (2000). Estos autores plantean que la abundancia microbiana en ecosistemas marinos puede encontrarse en el orden de 10^9 y que el porcentaje de microorganismos cultivables es alrededor de 0,25% (10^6). Teniendo en cuenta estos resultados es necesario valorar aspectos tales como el método de aislamiento, medio de cultivo, la temperatura y el tiempo de incubación, entre muchos otros factores que podrían garantizar una mayor concentración de microorganismos en las matrices en estudio.

Los resultados demostraron que el mayor porcentaje de bacterias aisladas corresponde a las Gram positivas (79%). En la literatura especializada es contradictoria la información acerca de la proporción de bacterias Gram positivas y Gram negativas en el mar. Mientras algunos autores plantean una mayor abundancia de bacterias Gram negativas en ecosistemas marinos, debido a que su pared celular está mejor adaptada a sobrevivir en este medio (Lugioyo, 2003); otros refieren que las Gram positivas se encuentran en mayor porcentaje respecto al total de la microbiota marina, en particular los bacilos esporulados por su capacidad de adaptarse a diferentes ambientes (Fenical y Jensen, 1996).

No obstante, es importante destacar que una gran parte de las investigaciones sobre microbiología marina están dirigidas a detectar grupos fisiológicos a partir de muestras marinas, y a diferencia de este estudio, no incluyen la determinación de un grupo particular de los cultivables. La mayor proporción de bacterias Gram positivas aisladas pudiera estar relacionado con la posibilidad que tienen de ser más fácilmente cultivables ya que poseen más resistencia a los cambios ambientales, quizás relacionado con la composición de la pared celular, en particular por la estructura entrecruzada del peptidoglicano que le confiere resistencia mecánica, fortaleza, moldea la forma celular y brinda una barrera para mantener la presión osmótica interna. Por otra parte, se debe tener en cuenta que, dentro de las bacterias Gram positivas se encuentran en un elevado porcentaje el grupo de las formadoras de esporas (Ej. Género *Bacillus*), que es una estructura de supervivencia en ambientes estresados.

Conservación de las cepas: A partir de los aislamientos realizados se crearon el banco maestro y el banco de trabajo de cada uno de los cultivos axénicos con el objetivo de conservar su genoma. Bajo esta premisa, es importante la selección de un método de conservación de microorganismos que garantice la viabilidad y estabilidad genética en condiciones restringidas de nutrientes, aeración y temperatura, con lo cual se reduce significativamente la actividad metabólica a través de un consumo mínimo de energía para mantenimiento celular.

La implementación de métodos de conservación a mediano y largo plazo de los cultivos en colección constituye uno de los requerimientos incluidos en la Guía para el establecimiento y funcionamiento de las colecciones según la Federación Mundial de Colecciones Microbianas (WFCC Standards Committee, 2010); de manera que se garantice el objetivo fundamental de las colecciones "ex situ".

En la Colección de Bacterias Marinas de CEBIMAR todos los cultivos se encuentran conservados en tubos con medio agarizado cubiertos con aceite mineral estéril para su conservación durante al menos 5 años y su evaluación periódica demostró la validez de este procedimiento de conservación para cepas de origen marino. Este método es muy empleado en laboratorios con pocos recursos dadas las posibilidades de mantener la biomasa bacteriana libre de contaminantes, evita la deshidratación y disminuye la actividad metabólica de las

cepas debido a la reducción de la tensión de oxígeno (Malik, 1991). También aparece descrito la supervivencia de cultivos durante 35 años para bacterias de géneros que se incluyen entre las cepas liofilizadas en este estudio, como *Bacillus*, *Corynebacterium* y *Micrococcus* (Rudge, 1991).

Así mismo, se ha implementado como método de conservación a largo plazo la liofilización para cultivos de gran interés de acuerdo a las potencialidades biotecnológicas que presenta. Este método es recomendado para la mayoría de las bacterias y otros microorganismos, con la ventaja de que estos se mantienen de modo inalterable en períodos de hasta 15 años, adecuando el preservante y las condiciones de trabajo del equipo a las cepas en cuestión (Malik, 1991).

Identificación taxonómica: La mayor parte de los investigadores en microbiología marina encuentran gran dificultad para identificar las bacterias de este ambiente, pues la taxonomía bacteriana está dirigida principalmente al servicio de la medicina, y los medios de diagnóstico introducidos comprenden una serie de ensayos y evaluaciones limitados a estos microorganismos. Por estas razones ha sido difícil para los investigadores desarrollar métodos de clasificación para ambientes extremadamente variables como el marino. Por otra parte el Manual de Bergey contiene descritos una proporción pequeña de bacterias marinas. Los métodos sugeridos son muy útiles para clasificar las bacterias marinas a nivel de género por la sencillez de su uso aunque tiene el inconveniente de ser poco preciso. La identificación taxonómica de los cultivos en colección constituye una de las tareas más importantes a realizar por los curadores. Sin embargo de acuerdo al número de aislados en colección (más de 400 cepas) y la disposición de los recursos esta actividad se ha desarrollado gradualmente, teniendo como criterio de selección los cultivos que presentan un mayor porcentaje de bioactividades.

A partir de la implementación de las pruebas convencionales sugeridas en el Manual de Bergey, donde se incluye la caracterización morfológica, cultural, fisiológica y bioquímica de cada grupo de bacterias se ha logrado la identificación del 45 % de los cultivos de la Colección de Bacterias Marinas del CEBIMAR, entre los que el 29% fue clasificado hasta el nivel de género y el 16 % hasta el nivel de especie.

De acuerdo a los resultados de la identificación en la colección se encuentran representados los siguientes géneros: *Aeromonas*, *Aneurinibacillus*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Corynebacterium*, *Halorubrum*, *Lactobacillus*, *Leifsonia*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas* y *Vibrio*, mientras que entre las especies se encuentran: *Alcaligenes aquamarinus*, *Bacillus brevis*, *Chryseomonas luteola*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Vibrio splendidus*, todas provenientes de las aguas territoriales cubanas.

Bioactividades: Las bacterias marinas por su naturaleza poseen procesos metabólicos adaptados a bajas temperaturas y realizan sus actividades a elevadas concentraciones de sales, elevadas presiones hidrostáticas, pH alcalinos e incluso condiciones anóxicas. Bajo estas condiciones moderadamente extremas pueden producir una serie de metabolitos, entre ellas se incluyen las enzimas: amilasas, glucanasas, pectinasas, agarasas, quitinasas, alginasas, lipasas, DNasas, esterases y proteasas; así como sustancias con actividad antimicrobiana, antitumoral, antiinflamatoria; entre otras de interés (Fenical y Jensen, 1996).

La Colección de Bacterias Marinas del CEBIMAR es una colección de interés biotecnológico, debido a las potencialidades y aplicación de las cepas que custodia, por lo que la evaluación de diferentes bioactividades también constituye una prioridad.

En los últimos años se ha hecho evidente la creciente resistencia de los microorganismos causantes de enfermedades infecciosas a los antibióticos comerciales comúnmente empleados, por lo que se impone la necesidad de búsqueda de nuevos antibióticos y con ello la exploración de ambientes tradicionalmente no explotados para tales fines, como es

precisamente el medio marino. En particular la evaluación de la actividad antimicrobiana de los cultivos de esta colección ha demostrado que el 44% produce compuestos que presentan actividad contra patógenos humanos, hongos fitopatógenos y patógenos de peces.

En el medio marino se ha descrito la abundancia de bacterias proteolíticas (Attaway y Zaborsky, 1993), que de acuerdo a las condiciones extremas de este medio pudieran constituir nuevos productos de aplicación en la industria. Los resultados de la evaluación de la actividad proteolítica evidenciaron que el 35% de las cepas presentó dicha actividad. Estos cultivos pudieran constituir fuentes de interés para la obtención de enzimas proteolíticas destinadas a la lisis de proteínas de origen animal y vegetal, en la preparación de quesos, en la fabricación de la salsa de soya, así como en la elaboración de pan y galletas hojaldradas.

La búsqueda de microorganismos marinos con actividad hemolítica demostró que el 43% presenta esta actividad; la cual 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).

Además se detectó que el 25% presentan la capacidad de producir biotensioactivos exocelulares de tipo emulgente, detergentes y solubilizadores. Estos compuestos tienen múltiples aplicaciones, para la industria como detergentes, emulgentes, humectantes e inhibidores de corrosión, entre otras (Banat, Makkar y Cameotra, 2000).

La importancia de los microorganismos degradadores de compuestos recalcitrantes radica en la función que ellos pueden desempeñar en la autodepuración del ecosistema marino, así como en su potencialidad en tratamientos de biorremediación de derrames de sustancias tóxicas, etc. (Núñez, 2003).

Los resultados de este ensayo demostraron que un gran porcentaje de las bacterias en colección fueron capaces de utilizar compuestos xenobióticos como fuentes de carbono y energía. En particular el 30% de las cepas degradan petróleo; mientras que el 14 % crecen en presencia de compuestos fenólicos. Debe destacarse que del total de cepas evaluadas respecto a ambos compuestos, se demostró que el 21 % presentó la capacidad de utilizar indistintamente estos sustratos como única fuente de carbono y energía. En la degradación de estas sustancias participan diversas enzimas oxidadoras inespecíficas que pudieran participar en mecanismos comunes de la degradación (Cabranes, 2005).

Como resultado de las evaluaciones de las bioactividades a los cultivos en colección se destaca que el 93% presentan actividades biológicas de interés y de ellas más del 50 % presentan tres o más potencialidades. Estas evaluaciones han demostrado el potencial de los microorganismos aislados de ecosistemas marinos para proveer productos naturales útiles en la medicina, la industria y el medio ambiente.

BIBLIOGRAFÍA

- Attaway, D. H. y Zardosky O. R. 1993. Marine Biotechnology, Vol. 1, Pharmaceutical and Bioactive Natural Products. 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.
- Borem, A., F.R. Santos and D.E. Bowen. 2003. Understanding Biotechnology Chapter 12 Biodiversity. Prentice Hall PTR, ISBN 0-13-101011 240 p.
- Cabranes, Y. 2005. Cinética de degradación de hidrocarburos del petróleo por *Bacillus alcalophilus* cepa CBM-225. Tesis de Maestría, Fac. Biología, U.H.
- 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..
- Giovannoni, S. 2002. High throughput culturing for microbial discovery In: Marine

Biotechnology in the Twenty-First Century, Problems, Promise and Products, National Research Council, National Academy Press, Printed in USA, 2002 ISBN 0-309-08342-7 p. 65.

- Giovannoni, S. y Rappé, M. 2000. Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes. En: *Microbial Ecology of the Oceans*. Ed. D.L. Kirchman, Wiley-Liss, New York. 47-84.
- Kirchman, D.L. 2000. Uptake and Regeneration of Inorganic Nutrients by Marine Heterotrophic Bacteria (Chapter 9). In: *Microbial Ecology of the Oceans*. Ed. D.L. Kirchman, Wiley-Liss, New York. 262-288,.
- Lugioyo, M. 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, 2003, 140 p.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M y Parker, J. Brook. 2003. *Biology of Microorganisms* Tenth Ed. Prentice Hall. New Jersey. ISBN 0-13-049147-0.1017.
- Malik, K. A. (1991). Maintenance of microorganisms by simple methods. *Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells: a Manual of Laboratory Methods*. Ed. B.E. Kirsop y A. Doyle 2nd Academic Press p. 121-132,.
- Miravet, M. E. (2003). Abundancia, actividad y diversidad de las bacterias heterótrofas en el Golfo de Batabanó y su uso como indicadores ambientales. Tesis de Doctorado. UH. Cuba
- Núñez, R.R. (2003). Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la biorremediación de derrames de hidrocarburos. Tesis de doctorado. Universidad de La Habana. Cuba.
- Rudge, R.H. 1991. Maintenance of bacteria by freeze-drying. *Maintenance of microorganisms by simple methods. Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells: a Manual of Laboratory Methods*. Ed. B.E. Kirsop y A. Doyle 2nd Academic Press p. 31-44
- Smith, D. 2003. The OECD Biological resource centres initiative: Accreditation for culture collections. *Newsletter UKFCC* 32: 2-3.
- WFCC Guidelines, 2010. World federation for culture collections guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms 3rd Edition, February 2010, Revised by the WFCC executive board ISBN 92 9109 043 3.