

Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente



Informe Final del Proyecto

“Diversidad de bacterias heterótrofas aisladas de ecosistemas marinos y costeros de Cuba”

2019

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES y MÉTODOS	4
2.1. Zonas de muestreo	4
2.1.1. Procesamiento de las muestras para el aislamiento	9
2.1.2. Determinación de la concentración de bacterias heterótrofas marinas y su aislamiento	9
2.1.3. Conservación de los aislamientos	9
2.2. Caracterización de capacidades metabólicas de los aislados	10
2.2.1. Asimilación de fuentes de carbono	10
2.2.2. Producción de enzimas hidrolíticas	10
2.2.3. Interacción con fuentes de nitrógeno	11
2.2.4. Solubilización de fosfato inorgánico	11
2.2.5. Actividad antimicrobiana	11
2.2.6. Actividad hemolítica	12
2.2.7. Producción de tensioactivos	12
2.2.8. Crecimiento en compuestos xenobióticos	12
2.3. Selección de microorganismos resistentes a compuestos fenólicos	13
2.4. Degradación de compuestos xenobióticos a escala de zaranda	13
2.4.1. Determinación de compuestos xenobióticos	14
2.5. Ubicación taxonómica de bacterias	15
2.6. Actividad total	16
2.7. Actualización de la base de datos de la colección	16
2.8. Tratamiento estadístico de los resultados	17
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
3.1. Distribución, aislamiento y caracterización de bacterias heterótrofas en ecosistemas marinos	19
3.2. Evaluación de capacidades metabólicas de los aislados	26
3.2.1. Asimilación de fuentes de carbono	26
3.2.2. Producción de tensioactivos	28
3.2.3. Actividad hemolítica	30
3.2.4. Producción de enzimas hidrolíticas	31
3.2.5. Interacción con fuentes de nitrógeno y fósforo	35
3.2.6. Ensayo de susceptibilidad antibiótica	38
3.3. Selección de cultivos degradadores de xenobióticos	41
3.3.1. Selección de microorganismos resistentes a compuestos fenólicos	41
3.3.2. Degradación de compuestos xenobióticos a escala de zaranda	43
3.4. Caracterización taxonómica de bacterias heterótrofas	51
3.5. Actualización de la base de datos de la colección	56
4. CONCLUSIONES	59
5. RECOMENDACIONES	60
6. BIBLIOGRAFÍA	61

RESUMEN

Este proyecto tuvo como objetivo ampliar el conocimiento de la diversidad microbiana en ecosistemas marinos de Cuba; a través del aislamiento y caracterización de bacterias heterótrofas. Se logró la caracterización de 392 cultivos aisladas de aguas aledañas a arrecifes coralinos, manglares y playas, los cuales presentaron gran diversidad metabólica. El 99,7% presentaron al menos una actividad biológica relacionada con la diversidad funcional y que permite estimar las capacidades de autodepuración de los ecosistemas. En particular, 209 cultivos presentaron multiactividad en potencialidades relacionadas con la degradación de diferentes fuentes de carbono y la producción de metabolitos. Los estudios de degradación de xenobióticos evidenciaron las potencialidades de cultivos microbianos, procedentes de áreas impactadas y no impactadas por disturbios antrópicos, de utilizar indistintamente compuestos fenólicos e hidrocarburos como única fuente de carbono y energía. Por su parte, la caracterización taxonómica de 22 cultivos seleccionados por sus potencialidades metabólicas demostró que el género *Bacillus* presentó mayor actividad biológica. Los géneros *Ochrobacterium*, *Pasteurella* y *Sphingomonas* se informan por primera vez para aguas próximas a los arrecifes coralinos en estudio. Todos los cultivos fueron depositados en la colección del Instituto de Ciencias del Mar y constituyen el soporte biológico de futuras investigaciones relacionadas con la taxonomía microbiana marina y el desarrollo de productos de interés biomédico, industrial y para el saneamiento ambiental.

1. INTRODUCCIÓN

Los organismos marinos presentan una amplia diversidad biológica determinada por la presencia de mecanismos bioquímicos y fisiológicos que permiten su supervivencia en un medio competitivo por la demanda de recursos y nutrientes. Las formas de vida en este hábitat han evolucionado y están expuestas a condiciones ambientales totalmente diferentes a las que habitan en el medio terrestre (Lauro *et al.*, 2009) y constituyen un enorme reservorio natural que justifica el desarrollo de investigaciones relacionadas con el incremento del conocimiento de su diversidad biológica.

En el contexto actual, los impactos sobre la biodiversidad de los ecosistemas marino costeros, determinados por la explotación indiscriminada de los recursos, contaminación, eventos extremos, etc., intensifica su vulnerabilidad y comprometen los beneficios y servicios ambientales que brindan ecosistemas claves como los arrecifes coralinos y los manglares.

Bajo esta premisa se requieren estrategias de adaptación con una valoración integrada del funcionamiento de los ecosistemas, tomando como base la evaluación de la vulnerabilidad de la biodiversidad; así como de los beneficios asociados a estos recursos genéticos.

En particular los microorganismos son un componente esencial de la diversidad biológica que garantiza el funcionamiento de los ecosistemas; ya que cumplen funciones únicas en los ciclos biogeoquímicos (fijación del nitrógeno, nitrificación, desnitrificación, fijación quimiolitotrófica del dióxido de carbono, formación de metano, reducción de sulfatos), en la formación del suelo, en la regulación del clima y en la composición atmosférica (Madigan *et al.*, 2012). Asimismo, esta multifuncionalidad determinada por una gran diversidad genética y metabólica proporciona una fuente poco explotada y de enormes perspectivas para la búsqueda de nuevos compuestos de interés.

Dentro de la diversidad microbiana, las bacterias heterótrofas resultan de gran interés por su actividad descomponedora y su participación en una amplia variedad de procesos fundamentales en el ecosistema marino, que incluyen desde el reciclaje de los nutrientes hasta la geoquímica de los sedimentos (Madigan *et al.*, 2012). La importancia de estas bacterias está determinada por dos funciones fundamentales: su actividad mineralizadora, que forma parte de la capacidad de autodepuración del ecosistema marino, y su papel en la trama trófica, al poner a disposición de los productores primarios elementos nutritivos y la producción de biomasa bacteriana que es consumida eficazmente por depredadores eucariontes (Glöckner *et al.*, 2012).

Actualmente es reconocida la posibilidad de utilizar indicadores microbiológicos para evaluar la calidad ambiental de los ecosistemas y la detección de condiciones ambientales desfavorables previamente a su repercusión en los organismos de niveles tróficos superiores. Sin embargo, la

comprensión del papel e importancia de este grupo en los ecosistemas es aún insipiente; dado por la carencia de información sobre la diversidad de especies y diversidad funcional en el ecosistema.

El desarrollo de la microbiología marina ha permitido demostrar que las comunidades microbianas que habitan en el mar son productoras de compuestos con actividades biológicas de importancia para el ecosistema (León *et al.*, 2010; Glöckner *et al.*, 2012). La interrelación entre los organismos no sólo se debe a relaciones tróficas, sino que la antibiosis también puede jugar un papel importante en la ecología marina, actuando como controles efectivos para mantener la diversidad de especies del ecosistema. Estas sustancias pueden ser liberadas al medio obstaculizando la colonización de las especies adyacentes por competidores. Estos compuestos no sólo inhiben a las bacterias terrestres sino también a cepas autóctonas, lo cual es de importancia ecológica considerable (Bowman, 2007).

Entre las múltiples aplicaciones de los microorganismos marinos se encuentran la capacidad de producción de fuentes de energía (hidrógeno, metano), tratamientos de desechos industriales (metales, plaguicidas, hidrocarburos) (Head *et al.*, 2006; Hau *et al.*, 2007); producción de aditivos (polímeros, tensioactivos, adhesivos) (Ortiz *et al.*, 2014, Antoniou *et al.*, 2015). Otros autores han demostrado que las bacterias marinas podrían ser una fuente potencial de polihidroxibutirato (PHB) que constituye una variante alternativa en la obtención de plástico degradable o "verde" (Lee *et al.*, 2009).

La microbiología marina de Cuba se ha encaminado fundamentalmente al estudio de la variación espacio-temporal de las bacterias heterótrofas, parámetros funcionales, como son la productividad y la intensidad del proceso de descomposición de la materia orgánica, y la diversidad de géneros; así como la evaluación de algunas potencialidades de interés biotecnológico (Miravet *et al.* 1993; Miravet *et al.*, 1994; Lugioyo, 2003; Claro *et al.*, 2007; Ortiz *et al.*, 2014). En la actualidad continua la necesidad de incrementar el conocimiento de la diversidad microbiana en los ecosistemas marinos; teniendo en cuenta que estos estudios no se han extendido hacia todas las zonas del archipiélago cubano; quedando un gran vacío de información de estos grupos en las regiones central y oriental del país.

Además, estas áreas presentan un importante desarrollo económico en las que se incluyen el turismo, la pesca, la actividad agropecuaria; así como la explotación y exploración petrolera costera hacia región noro-central de Cuba.

Por la importancia que reviste la conservación de la biodiversidad marino-costera, para minimizar los impactos sobre los servicios de los ecosistemas; resulta imprescindible desarrollar programas de evaluación y monitoreo encaminados a determinar el estado de vulnerabilidad de la biodiversidad. En particular, grupos insuficientemente estudiados como los microorganismos de gran importancia en los ecosistemas y que 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 (Giovannoni y Rappé, 2000; Yeon *et al.*, 2005).

Por otra parte; la identificación y caracterización de los cultivos microbianos en estos ecosistemas no solo contribuirá a ampliar el conocimiento de la diversidad bacteriana marina de Cuba; sino que además permitiría conocer otras potencialidades de uso y explotación de los servicios y beneficios que brindan los ecosistemas; garantizando el uso sostenible de los recursos genéticos disponibles de interés para la biotecnología y la biomedicina, a través de su conservación en colecciones *ex-situ* que permiten el mantenimiento y accesibilidad de cultivos puros, viables, y con estabilidad genética (Borem *et al.*, 2003).

Objetivo General:

Ampliar el conocimiento de la diversidad microbiana en ecosistemas marinos y costeros de Cuba; así como evaluar y caracterizar las potencialidades biotecnológicas de estos recursos genéticos.

Objetivos Específicos:

1. Caracterizar cultivos de bacterias heterótrofas marinas procedentes de ecosistemas marinos y costeros de Cuba.
2. Incorporar aislados de bacterias marinas proveniente de ecosistemas marinos y costeros no representados en la colección.
3. Evaluar diferentes capacidades metabólicas de las bacterias heterótrofas representados en los ecosistemas en estudio de como base de su diversidad funcional en los ecosistemas.
4. Evaluar la capacidad de utilización de compuestos xenobióticos por vía asimilativa de los aislados más promisorios para su posible uso en biorremediación ambiental.

2. MATERIALES y MÉTODOS

2.1. Zonas de muestreo

Para el aislamiento de las bacterias heterótrofas de ecosistemas marinos se realizaron muestreos en diferentes regiones de Cuba (Figura 1), en coordinación con otros proyectos de investigación y servicios científicos técnicos relacionados con la evaluación de la calidad ambiental de estos ecosistemas. Para el presente proyecto se seleccionaron áreas correspondientes a arrecifes, playas, y manglares. En particular, se trabajó en las aguas aledañas a los arrecifes del golfo de Cazones y del archipiélago Jardines de la Reina. Asimismo, en playas y manglares de la región occidental correspondiente a las penínsulas de Guanahacabibes e Hicacos; así como en zona oriental del país en la provincia de Guantánamo.

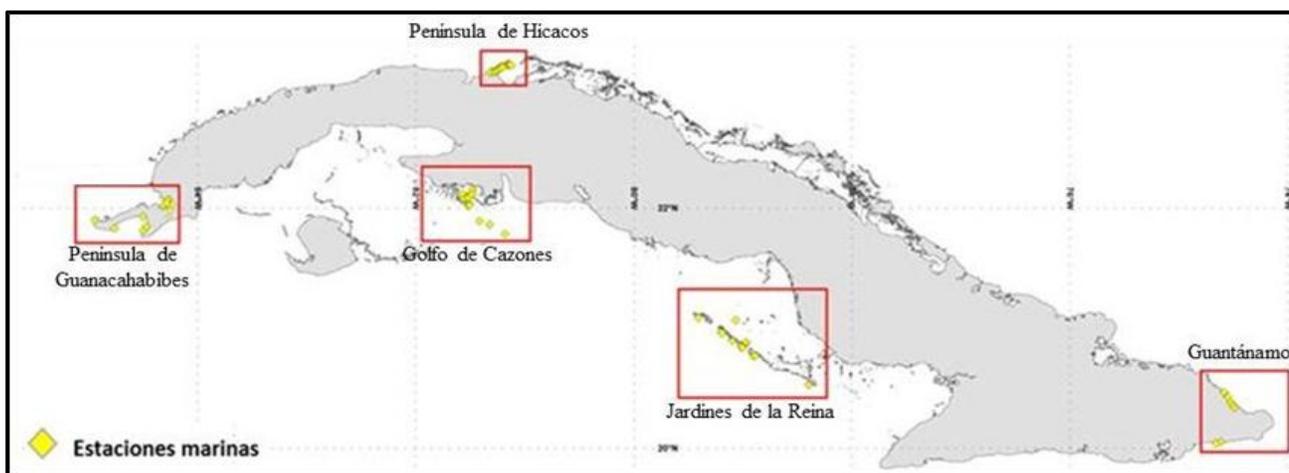


Figura 1. Ubicación de las regiones de trabajo.

La península de Guanahacabibes, localizada en el extremo más occidental de Cuba, posee alrededor de 80 % de su área con el reconocimiento internacional de Reserva de la Biosfera, declarada por la UNESCO desde 1987. Está conformada por dos penínsulas: la del Cabo de San Antonio, que se extiende hacia el oeste hasta el punto más occidental del territorio nacional (Cabo de San Antonio); y la de Corrientes, que se prolonga hacia el suroeste. La costa norte, cubierta por ciénagas y pantanos, se orienta sobre una ancha plataforma submarina de poca profundidad y el ascenso de la costa sur se caracteriza por acantilados, seborucos costeros y playas arenosas, donde la plataforma insular es estrecha (Delgado y Ferro 2006; Cobián *et al.*, 2013; Ruiz, 2017).

El área de estudio incluyó 12 estaciones de muestreo (Figura 1, Tabla 1), cinco correspondientes a sitios de playas en la costa sur de la península y siete estaciones en la costa norte, aledañas a los manglares que bordean la ensenada de la Fe, donde predomina la especie *Rhizophora mangle* (mangle rojo). En la parte sumergida abundan los pastos marinos, predominando las especies *Thalassia*

testudinum y *Syringodium filiforme*. Los muestreos fueron realizados en los meses de abril y octubre de 2016.

Tabla 1. Localización geográfica y siglas de los sitios de muestreos de la península de Guanahacabibes.

Sitios	Siglas	Latitud N	Longitud O
Norte de la península de Guanahacabibes			
Río Verde	R Ver.	22.0707°	-84.2677°
Estero de Guadiana	Es. Gua.	22.0870°	-84.2771°
Guadiana	Gua.	22.0719°	-84.2806°
Muelle	Mll.	22.0356°	-84.2873°
Playa las Conchas	Conc.	22.0243°	-84.2759°
Boca	Boc.	22.0189°	-84.3134°
Ensenada centro	E. Cent.	22.0346°	-84.2861°
Sur de la península de Guanahacabibes			
María la Gorda	M. G	21.8115°	-84.5016°
Uvero quemado	U. Q.	21.8484°	-84.4725°
La Bajada	Baj.	21.9295°	-84.5025°
La Barca	Bar.	21.8349°	-84.7665°
Las Tumbas	Tum.	21.8987°	-84.9373°

La península de Hicacos es una extensión de tierra de unos 22 km de largo y 700 m de ancho promedio, ubicada al norte de la provincia de Matanzas. Limita al norte con el estrecho de la Florida, al sur con la bahía de Cárdenas, al este con la ciudad de Cárdenas y al oeste con el archipiélago Sabana - Camagüey. Al norte de la península se encuentra la playa de Varadero, con más de 20 km de extensión que constituye principal destino turístico de sol y playa de Cuba. Por su parte la costa sur es generalmente cenagosa y parte de sus orillas está cubierta por manglares (Menéndez *et al.*, 2006).

Para la caracterización microbiológica se seleccionaron 15 estaciones ubicadas en la costa norte y sur de la península de Hicacos (Figura 1, Tabla 2). Los muestreos fueron realizados durante los meses de enero y septiembre de 2015, correspondientes a épocas contrastantes (poco lluviosa y lluviosa respectivamente).

Las zonas de arrecifes coralinos seleccionadas están contenidas en el Sistema Nacional de Áreas Protegidas de Cuba. El golfo de Cazonos pertenece al Parque Nacional Ciénaga de Zapata (CECM 6291/08) y al Área Protegida de Recursos Manejados Península de Zapata (CECM 6871/10). El archipiélago Jardines de la Reina cuenta con la categoría Parque Nacional desde 2010 (Hernández-Fernández *et al.*, 2011) y está considerado la mayor reserva marina del Caribe (Appeldoorn y Linderman, 2003) con una elevada diversidad biológica (Linton *et al.*, 2002).

Tabla 2. Localización geográfica y siglas de los sitios de muestreos de la península de Hicacos.

Estaciones	Siglas	Latitud N	Longitud O
Iberostar Los tainos	N2	23.1994°	-81.1593°
Arenas doradas	N3	23.1866°	-81.1850°
Plaza América	N4	23.1751°	-81.2104°
Club Barracuda	N6	23.1552°	-81.2511°
Calle 13	N8	23.0717°	-81.1701°
Playa Caleta	N9	23.1328°	-81.3053°
Oasis	N10	23.1319°	-81.3154°
<u>E</u> de la salida del canal de Paso Malo	S2	23.1306°	-81.2778°
Centro Isla del Sur	S3	23.1374°	-81.2739°
Calle 36 Piedra del Chino	S4	23.1413°	-81.2665°
Calle K frente a estación meteorológica	S6	23.1575°	-81.2302°
PTR Sol Palmera	S7	23.1730°	-81.1986°
Taíno II	S9	23.1888°	-81.1647°
Frente a Cy. Libertad y Cy. Buba	S11	23.1849°	-81.1199°
Canal de Las Morlas, al W de Marina Gaviota	S12	23.1919°	-81.1428°

El golfo de Cazonos está ubicado al E del golfo de Batabanó, donde la plataforma cae abruptamente en una entrante profunda y angosta que termina hacia el norte con una forma circular conocida como ensenada de Cazonos. Hacia el E del golfo se localiza una amplia zona de lagunas interiores de poca profundidad y ricas en sedimentos de origen marino. Los arrecifes de coral de este golfo se clasifican como arrecifes de franja o de borde de plataforma, presentándose con o sin crestas (González-Ferrer, 2004). Las áreas incluyeron cinco sitios cercanos a crestas arrecifales (profundidad = 1,5-2 m) y ocho a los arrecifes frontales (profundidad = 10-14 m) (Figura 1, Tabla 3).

Tabla 3. Localización geográfica y siglas de los sitios de muestreos en el golfo de Cazones. Orientado de Norte a Sur.

Nombre de las estaciones	Siglas	Latitud N	Longitud O
Crestas arrecifales del golfo de Cazones			
Sur de la ensenada de Cazones (Nirvana)	S-EC	22.0994°	-81.5192°
Sureste de cayo Diego Pérez 2	SE-Cy.DP2	22.0366°	-81.5145°
Sureste de cayo Diego Pérez 1 (Faro)	SE-Cy.DP1	22.0221°	-81.5157°
Cayo Sigua	Cy.Si	21.8915°	-81.4174°
Vizcaínos	Vi	21.7854°	-81.1808°
Arrecifes frontales del golfo de Cazones			
Este de la ensenada de Cazones	E-EC	22.1572°	-81.4848°
Sur de la ensenada de Cazones	S-EC	22.0891°	-81.5169°
Este de cayo Diego Pérez	E-Cy.DP	22.0862°	-81.5701°
Sureste de cayo Diego Pérez 2	SE-Cy.DP2	22.0365°	-81.5065°
Sureste de cayo Diego Pérez 1	SE-Cy.DP1	22.0214°	-81.5102°
Oeste de la ensenada de Cazones	O-EC	22.1244°	-81.5713°
Cayo Blanco	Cy.Bl	21.8630°	-81.3241°
Cayo Los Pinos	Cy. LP	22.1155°	-81.4837°

El archipiélago Jardines de la Reina se extiende desde el golfo de Guacanayabo hasta la bahía de Casilda en la parte meridional de la Isla de Cuba. Su extensión es de 360 km y está formado por 661 cayos. En esta zona se encuentran arrecifes de barrera y de banco (González-Ferrer, 2004). El área para la caracterización microbiológica de Jardines de la Reina incluyó seis crestas arrecifales (profundidad = 1-1,5 m) y cinco arrecifes frontales localizados en la zona ecológica de veril (profundidad = 10 m) (Figura 1, Tabla 4).

Los muestreos en diferentes sitios de los arrecifes de coral del golfo de Cazones (GC) fueron realizados en los meses de septiembre 2015 y abril 2017 y en el archipiélago Jardines de la Reina en octubre de 2015, abril y noviembre de 2017.

Tabla 4. Localización geográfica y siglas de los sitios de muestreos en el archipiélago Jardines de la Reina. Orientado de oeste a este

Nombre de las estaciones	Siglas	Latitud N	Longitud O
Crestas arrecifales del archipiélago Jardines de la Reina			
Noreste de cayo Caballones (Pequeño Edén)	NE-Cy.Ca	20.8770°	-78.9711°
Sureste de cayo Bretón	SE-Cy.Br	21.0878°	-79.4091°
Oeste 2 de cayo Grande	O2-Cy.Gr	20.9685°	-79.1991°
Este 2 de cayo Grande (Punta Bayameses este)	E2-Cy.Gr	20.8996°	-79.0952°
Centro de cayo Caballones (Punta Escondida)	C-Cy.Ca	20.8460°	-79.0194°
Cayo Anclitas	Cy.An	20.7723°	-78.9024°
Arrecifes frontales del archipiélago Jardines de la Reina			
Noreste de cayo Caballones	NE-Cy.Ca	20.8832°	-78.9706°
Punta Macao	Pt. Ma	20.5288°	-78.3983°
Este de cayo Bretón	E-Cy.Br	21.0673°	-79.0673°
Oeste 2 de cayo Grande	O2-Cy.Gr	20.9661°	-79.1989°
Este 2 de cayo Grande (Punta Bayameses este)	E2-Cy.Gr	20.8982°	-79.0953°
Este de cayo Caballones	E-Cy.Ca	20.8402°	-79.0006°
Este de cayo Anclita	E-Cy.An	20.7712°	-78.8859°

La provincia de Guantánamo en la región más oriental de Cuba, cuenta en su territorio con la Reserva de la Biosfera Cuchillas del Toa (creado en 1987) y el Parque Nacional Alejandro de Humbolt (creado en 1997 y la UNESCO le otorgó la categoría de Sitio Patrimonio Natural Mundial de la Humanidad en 2001). Entre las estaciones se incluyeron sitios de playas del litoral norte de la provincia, como Maguana, Maraví, Toa, Porto Santo y Bahía del Miel, ubicadas en aguas del océano Atlántico. Además, se incorporaron dos playas de la costa sur, en aguas del Mar Caribe, correspondientes a las playas Imías y Cajobabo (Ruiz, 2017).

Tabla 5. Localización geográfica y siglas de los sitios de muestreos de playas en la provincia de Guantánamo.

Estaciones	Siglas	Latitud N	Longitud O
Playa Maguana	Magn.	20.4678°	-74.5860°
Playa Maraví	Mrví.	20.4262°	-74.5514°
Playa Toa	Toa	20.3836°	-74.5253°
Playa Porto Santo	P. Sto.	20.3569°	-74.5058°
Bahía del Miel	Miel	20.3392°	-74.4858°
Playa Imías	Im.	20.0548°	-74.6168°
Playa Cajobabo	Cjbb.	20.0675°	-74.6584°

2.1.1. Procesamiento de las muestras para el aislamiento

Para los análisis de microbiología se colectaron muestras de agua de mar mediante buceo autónomo utilizando frascos de vidrio estériles de 250 mL de capacidad para las muestras de aguas. En el caso de las áreas de arrecifes coralinos las muestras de agua se colectaron aledañas a las crestas arrecifales o al arrecife frontal según correspondió.

El procesamiento de las muestras para los análisis de microbiología se realizó inmediatamente después de la colecta según la metodología descrita por Harrigan y McCance (1968) y Miravet *et al.* (2009). A partir de la muestra se realizaron diluciones decimales seriadas en agua de mar estéril y las diluciones seleccionadas se inocularon en superficie a razón de 100 μL por placa Petri con medio ZoBell 2216E agarizado (Oppenheimer y ZoBell, 1952), indicado para bacterias marinas. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente hasta 72 h para determinar la concentración de bacterias heterótrofas y el criterio de selección de los aislados de acuerdo a la frecuencia de aparición (Miravet *et al.*, 2009).

2.1.2. Determinación de la concentración de bacterias heterótrofas marinas y su aislamiento

La concentración de bacterias heterótrofas se determinó por el recuento total de colonias mediante un contador de colonias durante tres días consecutivos a partir de las 24 h y los resultados fueron expresados en $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ de muestra.

Para el aislamiento de los cultivos puros de bacterias heterótrofas se tomó como criterio de selección la frecuencia de aparición de las colonias de acuerdo a sus características culturales. Las colonias seleccionadas fueron aisladas por agotamiento en placas con medio ZoBell 2216E (Oppenheimer y ZoBell, 1952) y luego de 24 h se describieron sus características culturales con el empleo de un microscopio estereoscópico. La determinación de las características morfológicas y tintoriales se realizó mediante la tinción de Gram y su observación al microscopio óptico (ocular 16x, objetivo 100x). En el caso de las bacterias Gram positivas, además se realizó la tinción con verde malaquita (Harrigan y McCance, 1968) para la observación de la presencia o ausencia de espora.

Los cultivos axénicos fueron conservados en tubos con planos inclinados conteniendo el mismo medio de cultivo de aislamiento, según la metodología establecida por Benson (2001).

2.1.3. Conservación de los aislamientos

Los cultivos axénicos de bacterias heterótrofas fueron depositados y registrados en la Colección de Bacterias Marinas del ICIMAR a partir de la creación de los bancos maestros y de trabajo de acuerdo a sus características macro y microscópicas con el empleo de un microscopio estereoscópico y del microscopio óptico respectivamente.

Los cultivos fueron conservados para cada banco con seis réplicas en el medio ZoBell 2216E (Oppenheimer y ZoBell, 1952) por el método tradicional de subcultivos regulares bajo aceite mineral estéril y almacenados en refrigeración (5-10 °C) (Malik, 1991).

2.2. Caracterización de capacidades metabólicas de los aislados

Para la caracterización de las bacterias heterótrofas aisladas se tomaron en consideración la evaluación de la asimilación de diferentes carbohidratos como fuente de carbono y energía, producción de enzimas hidrolíticas; así como diferentes interacciones con fuentes de nitrógeno y fósforo. Además, se incluyeron potencialidades biotecnológicas como actividad antimicrobiana, hemolítica, producción de tensioactivos, la degradación de petróleo y compuestos fenólicos.

2.2.1. Asimilación de fuentes de carbono

La asimilación de carbohidratos como fuentes de carbono se determinó mediante el crecimiento de los aislados en medio para la asimilación de carbono (Atlas, 2010), suplementado con glucosa, manosa, sacarosa, lactosa y almidón al 1%. Los cultivos fueron inoculados a razón de 20 µL de suspensión bacteriana al 0,5 de la escala Mc Farland e incubado a 30±2 °C durante siete días, evaluándose diariamente. Se consideró como positivo el crecimiento bacteriano.

2.2.2. Producción de enzimas hidrolíticas

La evaluación de la hidrólisis de la caseína se realizó a partir de cultivos jóvenes (18-24 h), en el medio agar leche doble fuerza. Las placas fueron incubadas a 30 ± 2 °C durante 24 h. Las zonas claras alrededor del crecimiento indican actividad caseinasa y para confirmar la precipitación de las proteínas las placas fueron inundadas con una solución de ácido tricloroacético al 1% (Cowan-Steel's, 1995). Se empleó como control positivo de la actividad a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y como control negativo el medio estéril sin inocular.

La actividad gelatinasa se evaluó a partir de cultivos en medio de gelatina nutritiva (Harrigan y Mc Cance, 1968), que se obtiene al adicionar a caldo nutriente el 15% de gelatina. Los tubos de medio fueron inoculados por punción e incubados a 30 ± 2 °C, al cabo de las 24 h fueron sumergidos en agua helada por 5 min. Se consideró como positivo los tubos en los que la gelatina se mantuvo fluida luego del enfriamiento. Como control negativo se empleó el medio de cultivo estéril y como positivo el inoculado con *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

La producción de amilasas se evaluó a partir de cultivos en medio agar nutriente suplementado con almidón al 1% (Harrigan y Mc Cance, 1968). Las placas fueron inoculadas e incubadas a 30±2 °C y a las 24 h se evaluó la actividad inundando las placas con solución de lugol. La presencia de un halo incoloro alrededor del crecimiento indicó la producción exocelular de la enzima. Como control negativo se empleó el medio de cultivo sin inocular.

La actividad lipolítica fue determinada indirectamente por la hidrólisis del Tween 80 en el medio agar Tween (Harrigan y McCance, 1968). Las placas fueron inoculadas y se incubaron a 30 ± 2 °C, a las 24 h se evaluó la actividad como positiva por la aparición de zonas opacas alrededor del crecimiento bacteriano. Como control negativo se empleó el medio de cultivo estéril.

La determinación semicuantitativa de la actividad caseinasa, amilasa y lipasa, se calculó por la diferencia entre el diámetro del halo (actividad enzimática) y el diámetro de la colonia según la metodología propuesta por Dias *et al.* (2009).

2.2.3. Interacción con fuentes de nitrógeno

La reducción de nitrato se detectó mediante el método descrito por Harrigan y McCance (1968), inoculando el medio de agua de peptona al 0,2% de KNO_3 con la presencia de una campana de Durham. La incubación fue por 24 h a 30 ± 2 °C. La presencia de iones nitrito se detectó debido al cambio de coloración luego de la adición de los reactivos I y II de Griess-Ilosovay, mientras que la de iones nitrato por la adición de polvo de zinc.

En el caso de la fijación biológica de nitrógeno atmosférico fue evaluado de forma cualitativa a partir del crecimiento de los microorganismos en medio Burk's libre de nitrógeno (Wilson y Knight, 1952) en tubos de ensayo inoculados por punción e incubados a 30 ± 2 °C por 24 h. Posteriormente fueron realizados dos pases sucesivos en iguales condiciones cultivo. El crecimiento microbiano durante los tres pases consecutivos fue considerado como positivo a esta actividad.

La actividad amonificante se determinó en medio agua de peptona y NaCl (Atlas, 2010) y los tubos fueron incubados a 28 ± 2 °C durante 21 días. La aparición de un precipitado de color carmelita por reacción con el reactivo de Nessler confirmó la presencia de amonio.

2.2.4. Solubilización de fosfato inorgánico

La capacidad de solubilización de fosfato fue detectada mediante el crecimiento de los aislados en el medio NBRIP (Nautiyal, 1999), inoculado con 20 μL de suspensión bacteriana al 0,5 de la escala McFarland e incubado a 30 ± 2 °C. Se consideró como positivo la aparición de un halo de solubilización alrededor del crecimiento microbiano (zona transparente) y el cambio de color a amarillo por la producción de ácidos, la incubación se mantuvo durante siete días, evaluándose diariamente.

2.2.5. Actividad antimicrobiana

La producción de sustancias antimicrobianas por bacterias marinas se realizó con el empleo de tres cepas de referencia que incluían a: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, donadas por el Instituto de Higiene, Epidemiología y Microbiología y el Instituto Finlay de Sueros y Vacunas, y depositadas en la Colección de ICIMAR.

Los ensayos de susceptibilidad antibiótica fueron realizados por el método de difusión en placas Petri con agar Müeller-Hinton, empleando discos de papel de filtro (Whatman # 3) de 6 mm de diámetro impregnados con 100 µL de las muestras a evaluar.

Las muestras se prepararon a partir de extractos exocelulares 10 veces concentrados de cultivos fermentados libres de células, obtenidos en caldo nutriente e incubados durante 72 h en zaranda orbital rotatoria a 125 r·min⁻¹. Luego del tiempo de incubación se centrifugaron alícuotas de 2 mL de los caldos a 12x4 g durante 5 min en una centrífuga MiniSpin para eppendorf.

Las placas de Agar Müeller-Hinton fueron inoculadas de forma homogénea con suspensiones celulares correspondientes a 0,5 en la escala de Mc Farland de las cepas indicadoras empleando un aplicador. Los discos de papel de filtro impregnados con las muestras a evaluar fueron dispuestos de manera equidistante y con tres repeticiones.

Las placas fueron colocadas en refrigeración a 4 °C durante dos horas para facilitar la difusión y posteriormente incubadas a 37±2 °C durante 24 h. Los resultados fueron evaluados a partir de la formación de un halo de inhibición del crecimiento de las cepas patógenas por parte de los extractos a evaluar con respecto a discos de papel impregnados con el medio de cultivo estéril.

2.2.6. Actividad hemolítica

Esta actividad se determinó mediante la inoculación de cultivos de 18-24 h en placas con el medio agar sangre e incubadas a 30±2 °C durante 24 h. Las zonas claras en torno al crecimiento microbiano indican la actividad hemolítica (Cowan-Steel's, 1995) y se consideró como control positivo de la actividad a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y como control negativo el medio sin inocular.

2.2.7. Producción de tensioactivos

La producción de tensioactivos se evaluó en cultivos fermentados libres de células obtenidos de un medio compuesto por sales inorgánicas y como única fuente de carbono y energía la sacarosa (Villaverde *et al.*, 1997). Las muestras se incubaron en Erlenmeyers con 50 mL de medio de cultivo durante 24 h en zaranda orbital rotatoria a 125 r·min⁻¹. Posteriormente fueron centrifugadas a 7000xg y 4 °C durante 30 min., en una centrífuga Beckman J2-H5. Las determinaciones de tensión superficial del sobrenadante se realizaron por el método de anillo de Du Noüy (Plaza *et. al*, 2006) en un tensiómetro Krüss K 10 T. Como control negativo se empleó el medio de cultivo. Los cultivos con valores de tensión superficial ≤35 mN·m⁻¹ fueron considerados como productores de tensioactivos.

2.2.8. Crecimiento en compuestos xenobióticos

La evaluación del crecimiento microbiano en compuestos xenobióticos se realizó en medio Vela y Ralston (1978) agarizado y utilizando indistintamente como fuente de carbono petróleo Mesa 30 (10 g·mL⁻¹), fenol y pentaclorofenol (1 g·mL⁻¹). Las placas se inocularon sobre la superficie y se incubaron

a temperatura ambiente durante siete días. Pasado el tiempo de incubación se evaluó como positivas a las cepas que habían sido capaces de crecer en el medio según la metodología de Joseph (1996).

2.3. Selección de microorganismos resistentes a compuestos fenólicos

A partir de los cultivos de bacterias heterótrofas seleccionados por su versatilidad metabólica para la multiplicación celular en las diferentes fuentes de carbono evaluadas y actividad enzimática se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) para fenol y pentaclorofenol. Se consideró la CMI como la concentración más baja del compuesto a probar donde no se presentó crecimiento (Brozel y Cloete, 1991).

Para cada uno de los cultivos aislados se prepararon tres series de tubos de ensayo de 5 mL de capacidad con 3 mL de caldo nutriente suplementado con el sustrato a evaluar a las concentraciones descritas en la Tabla 6. Estas concentraciones de inicio fueron seleccionadas de acuerdo a la complejidad estructural de los compuestos a evaluar y a los niveles informados de descargas en el ambiente.

Tabla 6. Rango de concentraciones evaluadas para cada sustrato en el estudio de la CMI.

sustrato	Concentración (g L ⁻¹)
fenol	2,0-10,0
pentaclorofenol	0,5-2,5

Cada serie de tubos se inoculó a 0,2 unidades de DO a partir de cultivos de 24 horas en caldo nutriente (absorbancia de 0,2 a 650 nm corresponde aproximadamente a 10⁶-10⁷ UFC mL⁻¹). Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente, en condiciones estáticas durante una semana. La CMI de cada compuesto se determinó a las 24, 48 horas y a los 7 días; mediante la evaluación de la viabilidad de las células por el método de conteo en placa para asegurar la ausencia de actividad bactericida a las concentraciones usadas (Ahmad *et al.*, 1991).

2.4. Degradación de compuestos xenobióticos a escala de zaranda

A partir de los cultivos que presentaron los mayores valores de CMI para fenol y pentaclorofenol; así como por su crecimiento en petróleo como única fuente de carbono se realizaron estudios de crecimiento a escala de zaranda para cada uno de los sustratos evaluados.

Todos los experimentos desarrollados a escala de zaranda fueron realizados a partir de cultivos de 24 h en tubos de plano inclinado con agar nutriente. Los cultivos se inocularon a concentración inicial de 10⁵ cel·mL⁻¹ en Erlenmeyers de 250 mL de capacidad que contenían 50mL de medio Vela y Ralston (1978), suplementado con 1,00 g L⁻¹ de extracto de levadura. Se utilizaron como fuente de carbono indistintamente hidrocarburos (n-hexadecano, ciclohexano, naftaleno y fenantreno), fenol y

pentaclorofenol a 10,00 g L⁻¹, 1,00 g L⁻¹ y 0,25 g L⁻¹ respectivamente. Los cultivos fueron incubados en zaranda orbital a 125 r·min⁻¹ y 30 °C, durante el tiempo que se especifique para cada experiencia.

Durante la fermentación se tomaron muestras cada 5 o 24 h según la experiencia para la evaluación del crecimiento microbiano con respecto al control (medio de cultivo estéril) mediante el conteo total de células en cámara de Neubauer (Madigan *et al*, 2005).

Además, se determinaron los parámetros cinéticos velocidad específica de crecimiento (μ) y productividad máxima de biomasa (Pr).

La velocidad específica de crecimiento se determinó en la fase exponencial del crecimiento, mediante el modelo de crecimiento no restringido y la productividad se calculó según la expresión siguiente (López y Gódia, 1998):

$$Pr = \frac{\Delta X}{t}$$

donde:

ΔX : Variación de la concentración de biomasa durante el incremento.

t: Tiempo de duración del incremento.

2.4.1. Determinación de compuestos xenobióticos

Las determinaciones de concentración de sustrato se realizaron al final de la experiencia con respecto al medio de cultivo estéril.

Para la cuantificación de fenol se realizó una curva de la calibración preparada con los estándares de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 ppm, los cuales se filtraron a través de acrodiscos de nylon de 0,22 μ m de tamaño de poro y 13 mm de diámetro.

Para la validación del método se emplearon tres series de estándares de fenol y se procedió a determinar el coeficiente de correlación r para conocer si los puntos experimentales se ajustaban a la línea recta definida.

Tanto a los patrones como a las muestras se les registró el espectro UV-Visible cualitativo a λ desde 200 a 800 nm, en un Espectrofotómetro UV-Visible Shimadzu UV-160A. Se utilizaron cubetas de 1cm (cuarzo). Los espectros de los estándares se obtuvieron con referencia al agua destilada y el de las muestras con respecto al medio de cultivo.

La determinación de hidrocarburos y los productos intermediarios de la degradación después de la interacción con el cultivo, se realizó a partir de la recuperación de la fase orgánica obtenida mediante tres extracciones sucesivas (1:1) v/v con tetracloruro de carbono (CCl₄) y deshidratadas con Na₂SO₄ anhidro.

El análisis cualitativo de la fase orgánica resultante fue llevado a cabo mediante espectroscopía infrarroja en un equipo FTIR Modelo Mattson 1000 de la firma UNICAM. El estudio fue realizado en

la zona de 400-4000 cm^{-1} . Las muestras fueron disueltas en CCl_4 , eliminándose posteriormente el solvente en lámpara IR, y fueron estudiadas como película entre ventanas de KBr.

2.5. Ubicación taxonómica de bacterias

Para la caracterización taxonómica fueron considerados los cultivos aislados de sitios de importancia ecológica, de escasa representatividad en la colección y de mejores capacidades metabólicas y potencialidades biotecnológicas. En particular, fueron realizadas las pruebas convencionales sugeridas por Harrigan y McCance (1968) y Colwell y Grigorova (1987); así como las consideradas en el Manual de Bergey's (Kreig y Holt, 1984; Sneath, *et al.*, 1986) que incluyen la caracterización morfológica, cultural, fisiológica y bioquímica de acuerdo a los grupos morfofisiológicos de las bacterias seleccionadas.

Para el caso de los cocos Gram positivos se procedió según la metodología planteada por Benson (2001), la cual se basa en lo descrito en el Manual Bergey's de Bacteriología. Entre las evaluaciones se consideró la forma de agrupación de las células, la actividad oxidativa o fermentativa frente a la glucosa por el método de Hugh y Leifson (Harrigan y McCance, 1968) y para la evaluación de la reducción del nitrato se empleó el método No. 1 de Cowan y Steel's (1995); otras pruebas consideradas fueron la presencia de catalasa y oxidasa, motilidad, comportamiento en el medio SIM (producción de SH_2 , indol y motilidad), fermentación de los azúcares L-arabinosa, fructosa, D-galactosa, manosa, sacarosa, lactosa y trehalosa, crecimiento en agar anaerobio, las actividades α -amilasa, gelatinasa y lipasa (Benson, 2001; Harley, 2002).

Para las formas bacilares Gram positivas y esporulados, se tuvo en cuenta la forma y posición de la espora en la célula; así como algunas pruebas específicas recomendadas por Priest (1989, 1993) con el fin de poder diferenciar entre las posibles especies. Las pruebas incluyeron la presencia de catalasa y oxidasa, Voges Proskauer, formación de ácido y de gas a partir de glucosa, hidrólisis del almidón, de la caseína y de la gelatina, utilización del citrato como fuente de carbono, hidrólisis de la lecitina, formación de indol y motilidad, rojo metilo, fermentación de los azúcares L-arabinosa, fructosa, D-galactosa, manosa, sacarosa, lactosa y trehalosa, crecimiento en NaCl al 2%, 5% y 10%, hidrólisis del Tween 80 y la urea.

Para la identificación de los bacilos Gram positivos no esporulados, como primer criterio se evaluó el ciclo de vida a partir de las características culturales en diferentes medios (sólidos y líquidos) en el tiempo. Además fueron consideradas las pruebas que incluyen los requerimientos de oxígeno, presencia de catalasa, motilidad, utilización del citrato como fuente de carbono, hidrólisis de la lecitina, formación de indol, rojo metilo, Voges Proskauer, reducción de nitrato, fermentación de los azúcares

L-arabinosa, fructosa, D-galactosa, manosa, sacarosa, lactosa y trehalosa, crecimiento en NaCl al 2%, 5% y 10%, hidrólisis del almidón, de la caseína, de la gelatina, Tween 80 y la urea.

Para la identificación bioquímica de los bacilos Gram negativos asporógenos se empleó el sistema API 20NE, con la utilización del software de identificación bacteriana APILAB Plus; que permite interpretar los perfiles bioquímicos obtenidos en las galerías de identificación (APILAB Plus, 2001).

2.6. Actividad total

El cálculo de la actividad total de las cepas seleccionadas (ATC) fue realizado de acuerdo a los resultados de todas las pruebas bioquímicas evaluadas y las bioactividades, por medio de la expresión propuesta por Kolbe-Boelke *et al.* (1988):

$$ATC(\%) = \frac{\text{N}^\circ \text{ de pruebas positivas}}{\text{Total de pruebas seleccionadas}} \cdot 100$$

donde:

ATC: Actividad total de las cepas referidas al porcentaje de pruebas que dieron positivas con respecto al total de pruebas ensayadas seleccionadas.

2.7. Actualización de la base de datos de la colección

La Base de Datos de la Colección de Microorganismos Marinos contempla los registros de los cultivos en colección y asegura disponer de toda la información referente a la fecha del aislamiento, fuente de procedencia, ubicación geográfica de donde fue aislado; así como las características de los cultivos según lo establecido por la Federación Mundial de Colecciones Microbianas (1999) y los Lineamientos para las Colecciones Cubanas de Cultivos Microbianos (Iglesias *et al.*, 2005).

Para esta etapa se actualizó la información de los cultivos de bacterias incorporados a partir del desarrollo diversos proyectos de investigación y servicios científicos técnicos de la institución.

La base de datos fue reprogramada en la versión SQL SERVER 2007; a partir de la necesidad de trabajar en soportes más interactivos y facilitar el acceso a la información; así como la incorporación de nuevas bioactividades evaluadas.

La información de todos los cultivos incorporados a la colección durante la etapa aparece registrada en un formato de 13 tablas, de las cuales las fundamentales aparecen a continuación:

1. cepasTb: Información relacionada con las características principales de cada cepa. Los campos que la componen son los siguientes:

Número de cepa	Características morfológicas
Número viejo	Gram (+ o -)
Área Geográfica	Estado de la cepa (Viva o Muerta)
Colección (Marina, Macroorganismos o Xenobióticas)	Características celulares
Fecha del aislamiento	Medio de cultivo de aislamiento
Persona que realizó el aislamiento	Designación taxonómica
Fuente de aislamiento	
2. actividadesTb: En esta tabla se almacenan las diferentes bioactividades o capacidades metabólicas de las bacterias en colección y constituyen los campos de la tabla.

<i>Aspergillus niger</i>	Proteólisis (Gelatina)
--------------------------	------------------------

<i>Aeromonas salmonicida</i>	Hidrolisis del almidón
<i>Bacillus subtilis</i>	Lipolisis
<i>Candida albicans</i>	Fijación de nitrógeno
<i>Staphylococcus aureus</i>	Reducción de nitrato
<i>Escherihia coli</i>	Oxidación de amonio
<i>Edwarsiella tarda</i>	Solubilización de fosfato
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Asimilación de glucosa
<i>Yersinia rukerii</i>	Asimilación de lactosa
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Asimilación de sacarosa
<i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo A	Asimilación de almidón
<i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo B	Asimilación de celulosa
<i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo C	Petróleo
<i>Streptococcus pneumoniae</i> serotipo 6B	Fenol
<i>Streptococcus pneumoniae</i> serotipo 19F	Pentacloro
<i>Streptococcus pneumoniae</i> serotipo 14	4clorofenol
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Mezcla de fenoles
<i>Salmonella typhi</i>	Valor de la Tensión Superficial Sacarosa (TSS)
<i>Staphylococcus epidermis</i>	Valor de la Tensión Superficial Hexadecano (TSH)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Valor de la Tensión Interfacial Sacarosa (TIS)
Intercalante de ADN	Valor de la Tensión Interfacial Hexadecano (TIH)
Hemólisis	Concentración Micelar Crítica (CMC)
Proteólisis (Caseína)	Balance Lípido – Hidrófilo (BLH)

3. crecimientosTb: En esta tabla se almacenan las capacidades de crecimiento en los medios de las bioactividades de las bacterias en colección y constituyen los campos de la tabla.

Hemólisis	Asimilación de la celulosa
Proteólisis (Caseína)	Petróleo
Proteólisis (Gelatina)	Fenol
Hidrolisis del almidón	Pentacloro
Lipolisis	4clorofenol
Fijación de nitrógeno	Mezcla de fenoles
Reducción de nitrato	Valor de la Tensión Superficial Sacarosa (TSS)
Oxidación de amonio	Valor de la Tensión Superficial Hexadecano (TSH)
Solubilización de fosfato	Valor de la Tensión Interfacial Sacarosa (TIS)
Asimilación de glucosa	Valor de la Tensión Interfacial Hexadecano (TIH)
Asimilación de lactosa	Concentración Micelar Crítica (CMC)
Asimilación de sacarosa	Balance Lípido – Hidrófilo (BLH)
Asimilación de almidón	

4. cCulturalesTb: Valores que describen las características culturales de la cepa en sus medios de conservación, donde se incluyen los campos siguientes:

Tamaño	Elevación
Cromogénisis	Superficie
Olor	Borde
Forma	Consistencia
Opacidad	Facilidad para emulsionarse en agua

5. administradoresTb: En esta tabla se almacenan los principales datos de los administradores de la colección con los siguientes campos:

Nombre	Usuario
Apellidos	Contraseña
Email	

2.8. Tratamiento estadístico de los resultados

Todas las determinaciones se realizaron con tres repeticiones.

Los datos de concentración de bacterias heterótrofas fueron normalizados mediante una transformación logarítmica. La normalidad de los datos transformados se verificó mediante la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza a través de la prueba de Bartlett. Toda

vez comprobada las premisas necesarias se realizó el análisis de varianza de clasificación simple. Para el análisis de comparación de medias se utilizó la prueba de rango múltiples de Duncan (Lerch, 1977). En los estudios de producción de tensioactivos y CMI se realizó un análisis de estadística descriptiva (histogramas). Los rangos de clases para la selección de cepas productoras de tensioactivos se determinaron según Planes (1988). Para la evaluación de la resistencia a compuestos fenólicos los rangos de clase fueron establecidos a partir de las concentraciones de sustrato utilizadas.

Todos los resultados fueron procesados con el paquete estadístico Statistica 4.0 y IBM SPSS 21.

El análisis de similitud de los aislados seleccionados por sus capacidades metabólicas se realizó por métodos aglomerativos jerárquicos mediante el coeficiente de similitud de Brays-Curtis empleando el programa estadístico PRIMER 6.1.6. Los agrupamientos que mostraron un nivel de similitud superior a 60% se consideraron “biotipos”.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Distribución, aislamiento y caracterización de bacterias heterótrofas en ecosistemas marinos

Las bacterias heterótrofas, componente mayoritario del total de microorganismos, tienen la característica de utilizar sustratos orgánicos para crecer y multiplicarse, por lo que la abundancia de estas bacterias constituye un índice de la cantidad de materia orgánica presente, y esta relación establece un nexo entre la cantidad de materia orgánica disuelta fácilmente degradable (lábil), capaz de ser oxidada por la actividad bacteriana (Ducklow, 2000).

La caracterización microbiológica de las aguas aledañas de los ecosistemas costeros en el Área Protegida de Recursos Manejados Península de Guanahacabibes no mostró diferencias significativas en las concentraciones de BHT en las áreas de playa del sur de la península para los dos períodos evaluados. En las estaciones de manglar de la costa norte se detectaron valores de concentración de bacterias heterótrofas totales (BTH) significativamente superiores para la época lluviosa, con excepción de la estación de río Verde, que en ambos períodos presentaron los valores máximos de concentración de BHT similares estadísticamente (Figura 2).

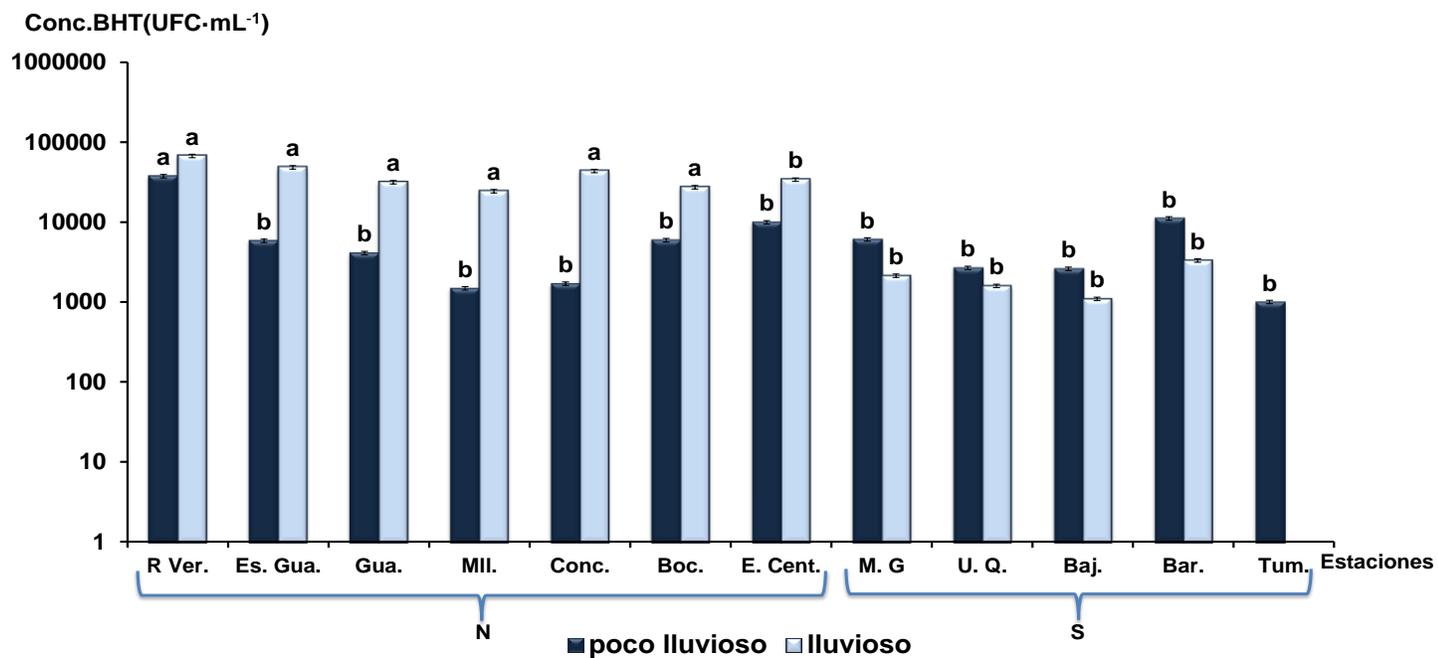


Figura 2. Concentración de bacterias heterótrofas totales (BHT) en las estaciones del norte (N, áreas de manglar) y sur (S, áreas de playa) de la península de Guanahacabibes para épocas lluviosa y poco lluviosa.

Los resultados de las áreas evaluadas cercanas a los manglares de la costa norte deben estar relacionados con el aporte de nutrientes y materia orgánica de ese ecosistema, que durante la época lluviosa se incrementa por el escurrimiento terrígeno. Por su parte los resultados de la costa sur deben estar relacionados con una menor concentración de materia orgánica y nutrientes, características de los

ecosistemas arenosos e influenciados por un mayor intercambio con las aguas oceánicas oligotróficas en el área (Victoria y Penié, 1998)

Los resultados de BHT en la zona costera de la península de Hicacos (Figura 3) indican aguas fundamentalmente clasificadas como mesoeutróficas ($6,5 \cdot 10^3 - 2,7 \cdot 10^4$ UFC·mL⁻¹) y eutróficas ($2,7 \cdot 10^4 - \geq 1,2 \cdot 10^5$ UFC·mL⁻¹) según el índice propuesto por Miravet *et al.* (2009), que evidencian niveles de alto contenido de materia orgánica. No obstante, se muestra un comportamiento diferente entre en la costa norte y la sur (Figura 3).

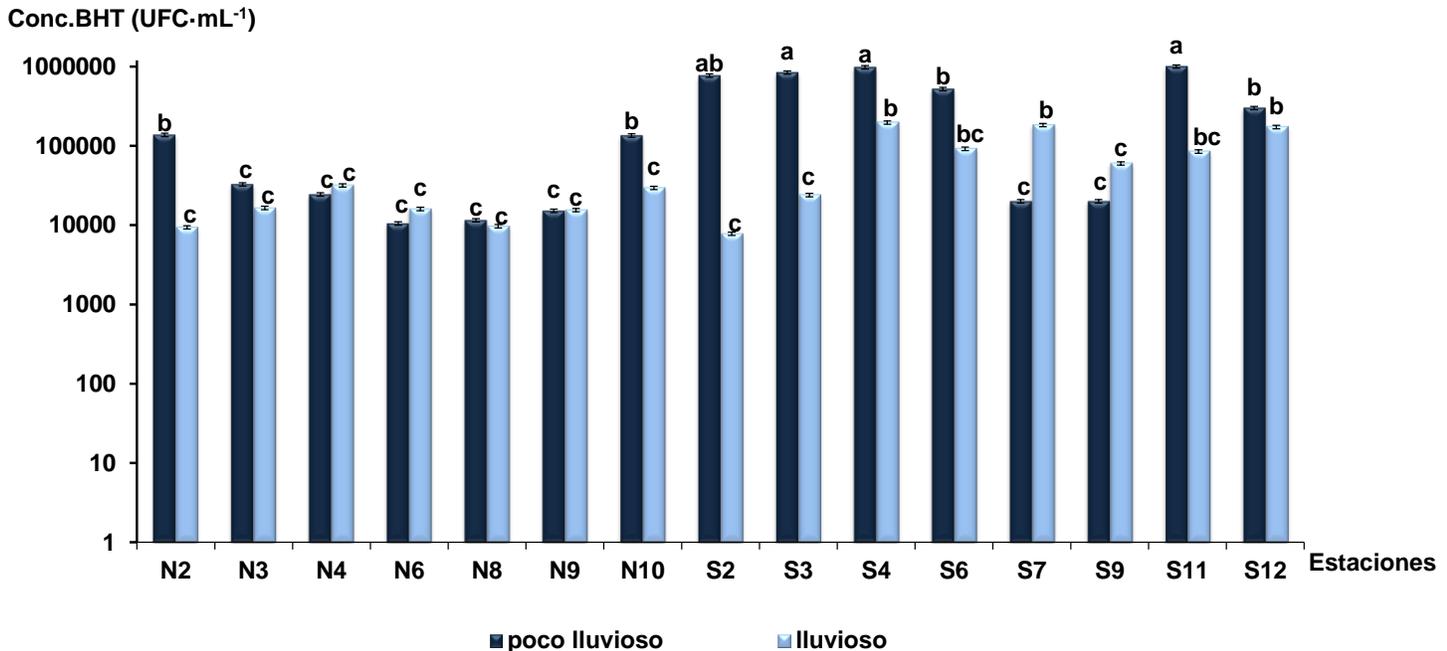


Figura 3. Concentración de bacterias heterótrofas totales (BHT) en las estaciones del norte (N) y sur (S) de la península de Hicacos para épocas poco lluviosa (enero de 2015) y lluviosa (septiembre de 2015).

En general para la costa sur se detectaron valores significativamente superiores con respecto a las estaciones de la costa norte, independiente de la época de muestreo (Figura 3). En particular, para la costa sur se han detectado valores de demanda química de oxígeno (DQO) que representan hasta dos veces los de la costa norte de la península (Carmenate *et al.*, 2016).

Este comportamiento debe estar relacionado con el contenido de materia orgánica y nutrientes características de la costa sur de la península de Hicacos, que es generalmente cenagosa y cubierta por manglares. Además, el litoral sur de la península recibe el aporte de contaminación orgánica procedente de las actividades de origen marítimo-portuario y turístico que se desarrollan en la bahía Cárdenas. En particular, existen antecedentes que el índice de calidad de agua en el acuatorio, de acuerdo a la evaluación de nutrientes, corresponde a la categoría de marginal, relacionada con el deterioro frecuente de las condiciones ambientales (Montalvo *et al.*, 2014).

En el golfo de Cazonos las concentraciones de bacterias heterótrofas totales (BHT) para las aguas aledañas a las crestas y arrecifes frontales alcanzaron órdenes entre 10^3 - 10^4 UFC·mL⁻¹ en ambos años de muestreo (Figura 4). En general, para este indicador se registraron valores superiores en los arrecifes frontales con respecto a las crestas arrecifales, aunque no resultaron significativamente diferentes.

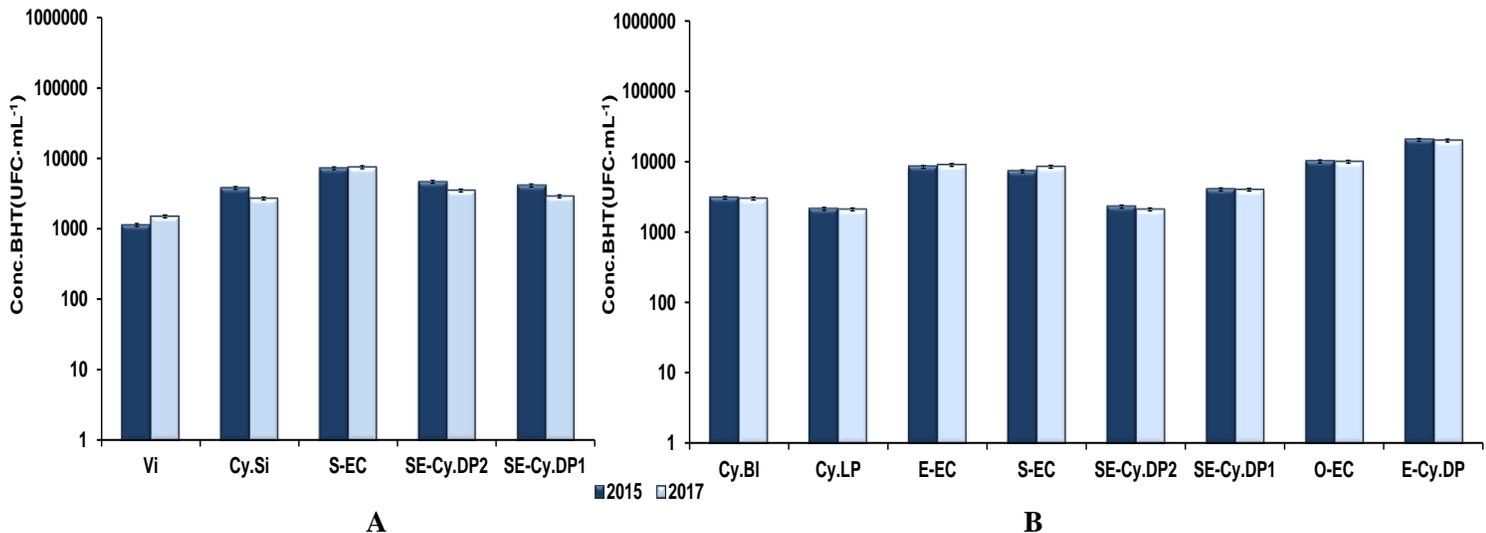


Figura 4. Concentración de bacterias heterótrofas totales (BHT) en los sitios ubicados en las crestas arrecifales (A) y en los arrecifes frontales (B) en el golfo de Cazonos para los meses de septiembre de 2015 y abril de 2017.

Para la época de lluvia (septiembre de 2015) y poco lluviosa (abril de 2017) se registró similar comportamiento para los valores extremos de concentración de BHT en las aguas próximas a las crestas y los arrecifes frontales del golfo de Cazonos. En particular, en las áreas de las crestas arrecifales la mínima y máxima concentración de este grupo de microorganismos se registró en el sitio Vizcaínos (Vi) y al sur de la ensenada de Cazonos (Nirvana) (S-EC) respectivamente (Figura 4A). En las aguas de los arrecifes frontales las concentraciones más bajas se encontraron en C.LP (Cayo Los pinos) y en SE-Cy.DP2 (Sureste de cayo Diego Pérez 2) (Figura 4B). Por su parte las concentraciones más altas detectadas en los arrecifes frontales corresponde al sitio E-Cy.DP (Este de cayo Diego Pérez) (Figura 4B).

Para el área del golfo de Cazonos se han referido altas concentraciones de bacterias heterótrofas, en el orden entre 10^3 - 10^4 UFC·mL⁻¹ (Lugioyo *et al.*, 2007), similares a las encontradas en este estudio. Asimismo, estas concentraciones resultaron superiores a los informados para los arrecifes del archipiélago de los Canarreos (Miravet, 2003) y similares para los del archipiélago Sabana-Camagüey (Miravet *et al.*, 1994).

Las concentraciones de bacterias heterótrofas totales (BHT) para las aguas aledañas a las crestas y arrecifes frontales en el archipiélago Jardines de la Reina variaron significativamente entre los años de

muestreo. En particular, los muestreos realizados en septiembre de 2015 y abril de 2017 presentaron valores de concentración significativamente superiores ($10^3 - 10^4$ UFC·mL⁻¹) en crestas y arrecifes frontales con respecto a noviembre de 2017, donde la mayoría de los sitios evaluados alcanzaron órdenes solo de hasta 10^2 UFC·mL⁻¹ (Figura 5). Este comportamiento pudiera estar relacionado con las menores temperaturas informadas en la época de la expedición y que fue realizada luego del paso del huracán Irma, en septiembre de 2017, lo cual pudo ocasionar disturbios en la columna de agua.

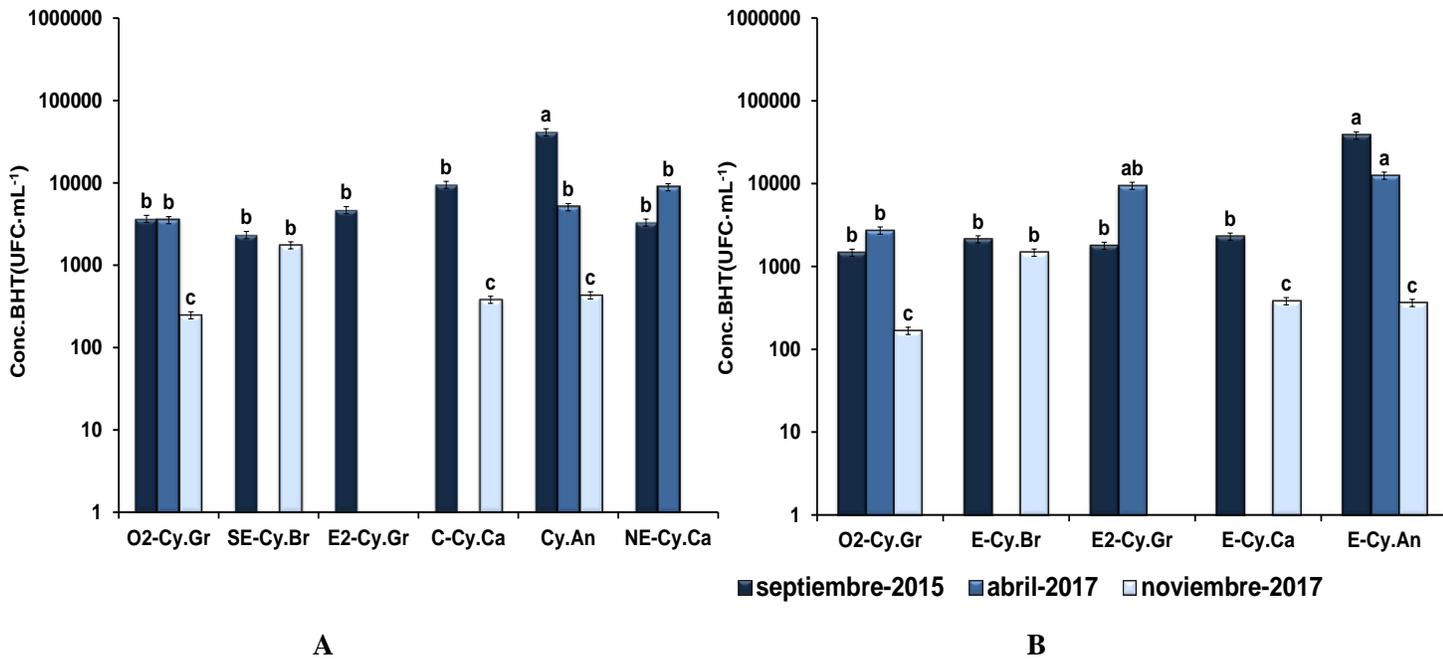


Figura 5. Concentración de bacterias heterótrofas totales (BHT) en los sitios ubicados en las crestas arrecifales (A) y en los arrecifes frontales (B) en el archipiélago Jardines de la Reina para los muestreos realizados en 2015 y 2017.

Las concentraciones de BHT en las aguas de ambos biotopos del archipiélago Jardines de la Reina coinciden con los valores informados en áreas adyacentes a los golfos de Ana María y Guacanayabo (Lugioyo y Alfonso 2016); así como a las encontradas en las aguas de los arrecifes del archipiélago de los Canarreos y el archipiélago Sabana-Camagüey (Miravet *et al.*, 1994; Miravet, 2003).

Las elevadas concentraciones de BHT encontradas en aguas aledañas a las crestas arrecifales como en los arrecifes frontales del golfo de Cazonos y del archipiélago Jardines de la Reina debe estar relacionada con la disponibilidad de materia orgánica en el medio que estimula la duplicación y el desarrollo de estos microorganismos. En particular, Loza *et al.* (2017) refieren de niveles de materia orgánica (DQO), en la columna de agua de ambas áreas, que superan los valores informados para los arrecifes del golfo de Batabanó (Miravet *et al.* 2000). Los estudios realizados por Loza *et al.* (2017) indican que el origen de nutrientes y materia orgánica, en estos arrecifes alejados de los disturbios antrópicos de la isla principal, procede de aportes alóctonos de las aguas enriquecidas provenientes de

las plataformas aledañas (golfos de Batabanó, Ana María y Guacanayabo) (Lugioyo y Alfonso 2016) y de manera autóctona a partir del metabolismo autotrófico y por la muerte de los organismos de estos ecosistemas, que se caracterizan por una amplia biodiversidad (Alcolado *et al.*, 1999).

El análisis de concentración de bacterias heterótrofas totales en aguas de las playas de la provincia de Guantánamo para el muestreo realizado en época poca lluviosa del año 2015 mostró diferencias significativas entre las estaciones (Figura 6). En particular, las estaciones del norte de la provincia, ubicadas en el área marina protegida (playa Maguana, playa Maraví y playa Toa), presentaron los valores mínimos de concentración de BHT (10^3 UFC·mL⁻¹).

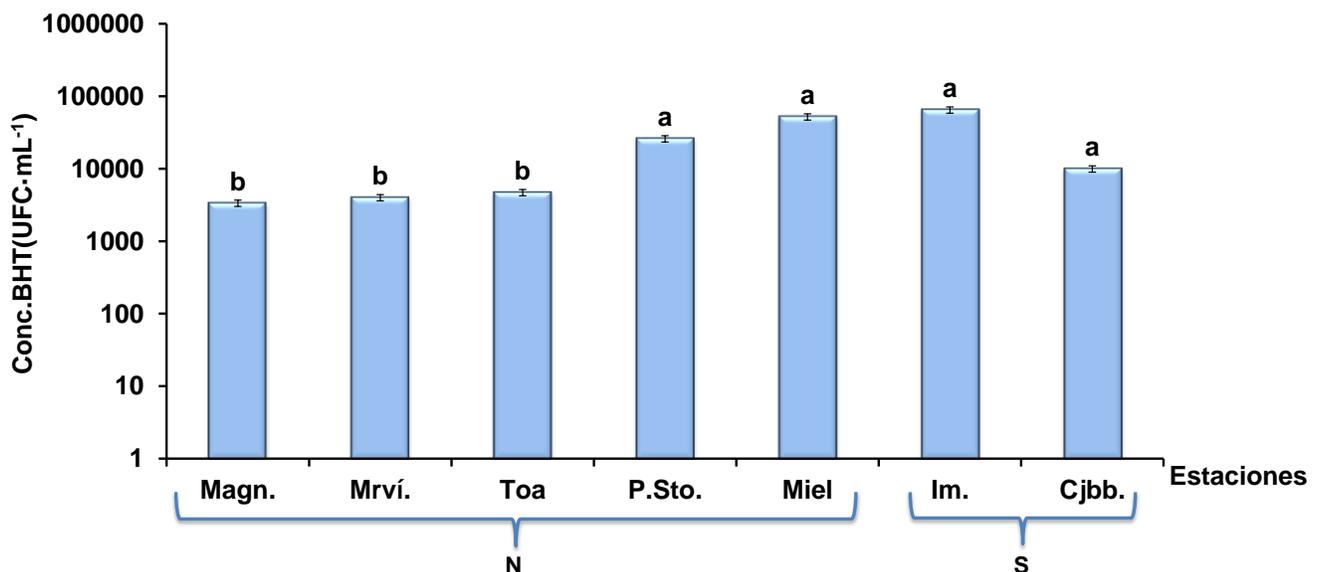


Figura 6. Concentración de bacterias heterótrofas totales (BHT) en las estaciones del norte (N) y sur (S) de la provincia de Guantánamo en febrero de 2015.

Para el resto de las estaciones se evidencia una mayor influencia del posible aporte de materia orgánica de origen terrígeno, así como la proveniente de los asentamientos costeros y el desarrollo hotelero en la región costera, como es el caso de la playa Puerto Santo (P. Sto).

En general, las concentraciones de bacterias en aguas de los diferentes ecosistemas alcanzaron valores entre 10^2 - 10^5 UFC·mL⁻¹. En particular, las aguas de las áreas de manglar presentaron los mayores valores de concentración, mientras en los arrecifes coralinos para ambos biotopos se detectaron las menores concentraciones.

Las concentraciones de bacterias heterótrofas encontradas en las zonas de estudio son inferiores a la referida por Giovannoni y Rappé (2000) y Glöckner *et al.* (2012). La abundancia microbiana en aguas de diferentes ecosistemas marinos se ha estimado en el orden de 10^9 y 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 la detección de una mayor concentración de microorganismos.

A partir de los muestreos realizados durante la ejecución del proyecto fueron aislados 342 cultivos de bacterias heterótrofas atendiendo a sus características culturales, determinadas por la variedad de formas, textura, tamaño y color. La distribución del número de aislamientos varió de acuerdo a las características de los ecosistemas marinos evaluados, así como la frecuencia de muestreo. Los aislamientos correspondientes a las aguas aledañas a arrecifes coralinos del sur de Cuba ascendieron a 147 cultivos; de ellos 92 son procedentes del archipiélago Jardines de la Reina y 55 del golfo de Cazones. Asimismo, en las áreas de la península de Guanahacabibes se aislaron 87 cultivos procedentes de áreas de playa y manglar. Por su parte en la península de Hicacos se obtuvieron 61 aislados, mientras 47 corresponden a áreas marinas de la provincia de Guantánamo.

La caracterización macroscópica de los aislados demostró que existe una gran variedad cultural de los aislamientos en las zonas en estudio, lo cual pudiera estar relacionado con la biodiversidad en estos ecosistemas. En general la descripción cultural de los cultivos aislados mostró que predominaron colonias puntiformes, redondas, irregulares y expansivas, de colores crema blanquecino, amarillo o naranja, de opacidad translúcida y otras opacas; de elevación convexa generalmente, superficie lisa brillante o mate, con bordes enteros y ondulados; así como de consistencia fundamentalmente viscosa y mantecosa.

En la Figura 7 se muestra la distribución morfofisiológica de las bacterias heterótrofas aisladas de muestras de agua de mar de los ecosistemas evaluados.

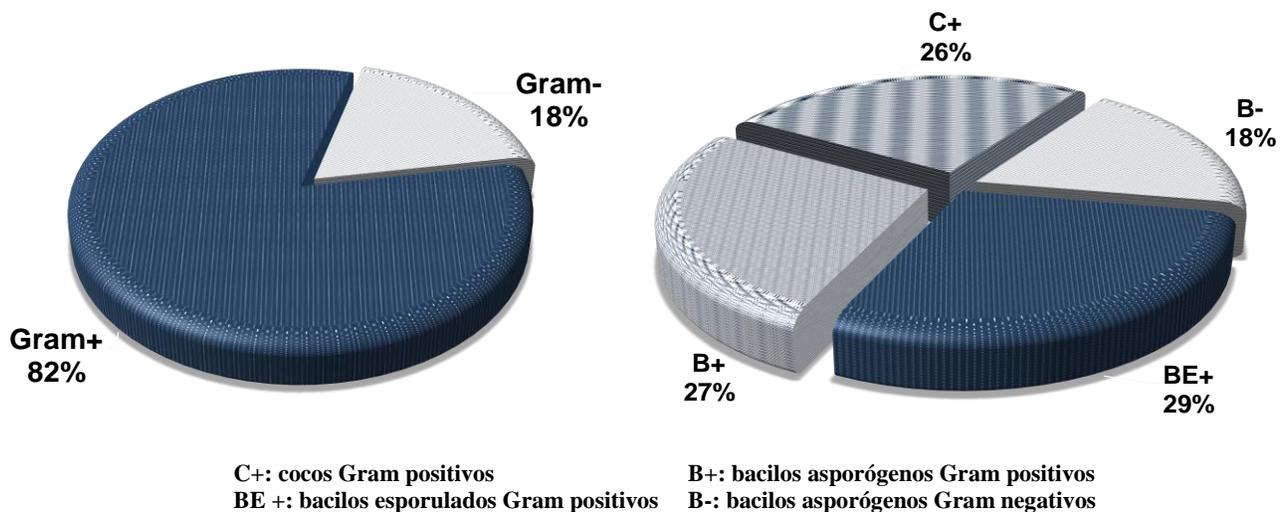


Figura 7. Distribución morfofisiológica de las bacterias heterótrofas aisladas de agua de mar de diferentes ecosistemas marinos.

Los resultados demostraron un mayor porcentaje de bacterias Gram positivas (85%) en el total de aislamientos. Esta distribución constituyó una generalidad para todas las áreas de estudio, con excepción de los arrecifes de Jardines de la Reina. En particular, para este ecosistema en el muestreo correspondiente a noviembre de 2017, donde se detectaron las menores concentración de bacterias heterótrofas (10^2 UFC·mL⁻¹), los aislamientos de bacterias Gram positivas representaron solo el 21,4% (9/42). Asimismo, la diversidad de aislamientos para ese muestreo, de acuerdo a las características culturales y celulares de los cultivos, fue superior a otros muestreos, donde se detectaron mayores concentraciones de bacterias heterótrofas.

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 (Zobell y Úpame; 1944; Moriarty y Hayward, 1982; Lakshmipriya y Sivakumar, 2012); 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; Garay, 2003).

No obstante, es importante destacar que parte de las investigaciones sobre microbiología marina están dirigidas a detectar grupos fisiológicos por métodos independientes de cultivos, a diferencia de este estudio. La mayor proporción de bacterias Gram positivas aisladas pudiera estar relacionada con la posibilidad que tienen de ser más fácilmente cultivables ya que poseen más resistencia a los cambios ambientales. Esta capacidad debe estar determinada por la composición de la pared celular de los Gram positivos, y específicamente 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.

Estos resultados coinciden con lo descrito por Miravet (2003) en aislamientos de bacterias heterótrofas en los arrecifes del golfo de Batabanó, SW Cuba, refiere una mayor frecuencia bacterias Gram positivas. Asimismo, en las aguas oceánicas adyacentes a Cuba entre 1988 y 1991 se encontró que el 69% de los aislados de bacterias fueron Gram positivas y de ellos el 48% pertenecían a especies del género *Bacillus* (Lugioyo, 2003).

A partir de los aislamientos del presente proyecto se crearon el banco maestro y el banco de trabajo de cada uno de los cultivos axénicos; con el objetivo de conservar el genoma de los mismos; así como caracterizar y evaluar sus potencialidades y capacidades metabólicas.

Todos los cultivos de nueva incorporación se encuentran conservados con seis réplicas de tubos con medio agarizado cubiertos con aceite mineral estéril para su conservación durante al menos cinco años. La evaluación periódica de su pureza, viabilidad y estabilidad de sus capacidades metabólicas ha demostrado la validez de este método de conservación durante la ejecución del proyecto.

Además, como parte del proyecto se trabajó en la caracterización de 50 cultivos aislados de aguas procedentes de manglares de la Ciénaga de Zapata (28) y de los arrecifes del archipiélago Jardines de la Reina (22), los cuales pertenecen a la Colección de Bacterias Marinas del ICIMAR. El total de aislamientos para su caracterización durante la ejecución del proyecto ascendió 392 cultivos.

3.2. Evaluación de capacidades metabólicas de los aislados

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. Estas características no solo permiten la detección de condiciones ambientales desfavorables, sino también constituyen la base de la capacidad de autodepuración de los ecosistemas. En particular, cumplen funciones únicas en los ciclos biogeoquímicos en el océano, asociadas a procesos metabólicos adaptados condiciones moderadamente extremas (Glöckner *et al.* 2012, Madigan *et al.* 2012).

Además, en estas condiciones moderadamente extremas pueden producir una serie de metabolitos de novedosas estructuras moleculares con interesantes propiedades farmacológicas (Kobayashi, 2008; Kita *et al.*, 2010; Ramlath *et al.*, 2018). 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 (Annie y Shanta, 2010; León *et al.*, 2010; Albadry *et al.*, 2014; Bensoussan *et al.*, 2014). También se ha referido la evaluación de estos compuestos en ensayos clínicos farmacológicos y otros como agentes de control biológico en la acuicultura (Choi *et al.*, 2012; Kazutoshiand y Misawa, 2014).

3.2.1. Asimilación de fuentes de carbono

Los resultados de la asimilación de diferentes carbohidratos como fuentes de carbono demostraron que el porcentaje de cepas degradadoras varió en función de la complejidad y accesibilidad del compuesto, independiente de las características de los ecosistemas marinos de aislamiento (Figura 8). Debe destacarse que el 93,1% (365/392) de los cultivos fueron capaces de utilizar al menos uno de los carbohidratos evaluados para el crecimiento celular, ya que estos compuestos constituyen fuentes de carbono y energía preferencial para el metabolismo microbiano (Shon y Vigneswaran, 2006).

En general, un alto porcentaje de los aislamientos fueron capaces de emplear indistintamente monosacáridos, disacáridos y polisacáridos como única fuente de carbono y energía, representando el

91,1% (357/392), el 78,3 (307/392) y el 72,2 (283/392) respectivamente. En particular, la glucosa presentó el mayor porcentaje de cepas degradadoras (91,1%), mientras solo el 53,8% (211/392) asimilan la lactosa. Estos resultados están relacionados con la presencia de enzimas constitutivas para la asimilación de glucosa en la mayoría de las bacterias heterótrofas, a diferencia de otros carbohidratos, que requieren la presencia del sustrato para la inducción de las enzimas involucradas en su catabolismo.

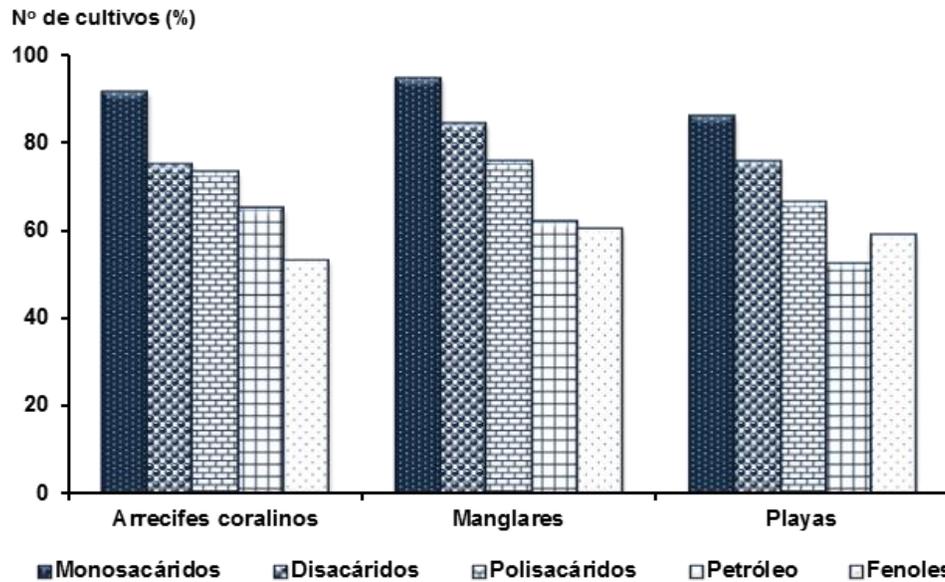


Figura 8. Distribución del porcentaje de bacterias heterótrofas aisladas de agua de mar de diferentes ecosistemas marinos en la asimilación de diferentes fuentes de carbono.

El contenido de carbohidratos en la materia orgánica del agua residual es de aproximadamente el 40% (Cunha y Almeida, 2009) caracterizado por la presencia de glucosa, manosa, xilosa (Shon y Vigneswaran, 2006), lactosa, sacarosa y almidón (Salgado *et al*, 2012). Los resultados evidencian la capacidad de respuesta a partir de la actividad microbiana en los ecosistemas marinos ante posibles disturbios antrópicos.

Por otra parte, se demostró que un alto porcentaje de los aislados fueron capaces de utilizar el petróleo para los procesos de multiplicación celular (60,7%, 238/392) o al menos uno de los compuestos fenólicos ensayados (56,9%, 223/392). Debe destacarse que 150 de las cepas evaluadas presentaron la capacidad de utilizar indistintamente hidrocarburos y fenoles 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 *et al.*, 2006; Seeger y Pieper; 2010; Fuentes *et al.*, 2014).

La base fundamental de la eliminación de compuestos orgánicos persistentes en sitios contaminados es la capacidad de degradación de materia orgánica que poseen los microorganismos (Morgante *et al.*,

2010). Las bacterias y los hongos tienen la capacidad de utilizar estos compuestos como fuentes de carbono y energía, transformando las moléculas en sustratos mediante procesos intracelulares que generan energía o forman los precursores para la síntesis de constituyentes celulares (Madigan *et al.*, 2012). En esta capacidad radica la función que pueden desempeñar en la autodepuración del ecosistema marino, así como en su potencialidad en tratamientos de biorremediación de derrames accidentales y de pasivos ambientales de compuestos persistentes (Bermúdez *et al.*, 2014; Fuentes *et al.*, 2014; Vinothini *et al.*, 2015).

La presencia de bacterias degradadoras de compuestos tóxicos en el medio marino puede estar determinada por la existencia de esas sustancias como resultado de la actividad antrópica. Las condiciones ambientales adversas fuerzan a los microorganismos a crear mecanismos de adaptación, entre los cuales se incluyen la activación de complejos enzimáticos que permiten el empleo de dichos compuestos como fuente de carbono y energía. Bajo estas condiciones el medio ejerce una presión selectiva mediante la cual se desarrollan capacidades metabólicas para la degradación y/o biotransformación de compuestos xenobióticos (Núñez, 2003).

En particular, los mecanismos de síntesis de enzimas constitutivas capaces de hidrolizar compuestos poliméricos representan rutas claves en la degradación de sustratos hidrófobos como lípidos e hidrocarburos (Lee *et al.*, 2015). También previo a la oxidación de hidrocarburos del petróleo por acción microbiana, se producen agentes con actividad superficial que propician el proceso de emulsificación de estos sustratos hidrófobos. Estos compuestos facilitan la formación de microemulsiones de hidrocarburos en el medio acuoso y la difusión de las gotitas de aceite hacia el interior celular (Jacobucci *et al.*, 2001; Baboshin y Golovleva, 2012).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, la identificación de cultivos con propiedades tensiométricas; producción de enzimas hidrolíticas y crecimiento en petróleo, constituyen criterios de selección de cultivos para la evaluación de procesos de degradación microbiana de hidrocarburos.

3.2.2. Producción de tensioactivos

La evaluación de la producción de tensioactivos microbianos estuvo dirigida a la búsqueda de sustancias que disminuyan la tensión superficial y en particular los de tipo emulgentes, que se caracterizan por disminuir las fuerzas de repulsión entre sustancias con poca afinidad estructural y desplazar la superficie de mezclas inmiscibles en la dirección de una de las fases, favoreciendo de esta forma su dispersión.

En la Figura 9 se muestra el histograma de los valores de tensión superficial de los extractos crudos obtenidos de los cultivos crecidos en el medio de fermentación, utilizando sacarosa como única fuente de carbono y energía.

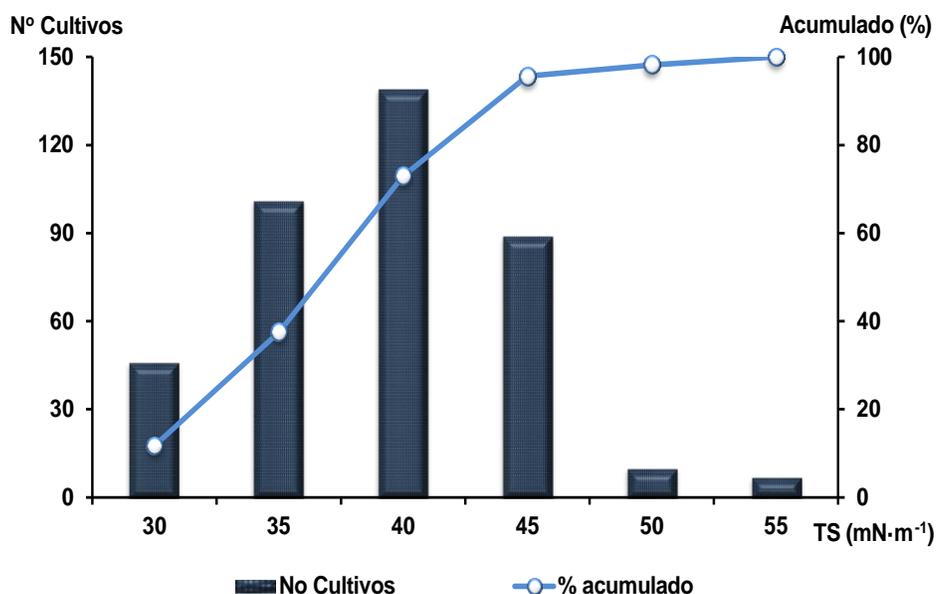


Figura 9. Distribución de los extractos evaluados según los rangos de clase para los valores de tensión superficial en sacarosa luego de 24 h de cultivo en zaranda orbital a 125 r·min⁻¹ y 30±1 °C.

El análisis de estadística descriptiva demostró que el 11,7% de los cultivos (46/392) producen compuestos con actividad superficial exocelular que disminuyen los valores de tensión superficial hasta 30 mN·m⁻¹ con respecto al control (50,3 mN·m⁻¹). Asimismo, se demostró que 101 cultivos se ubican en el rango de clase de hasta 35 mN·m⁻¹; mientras 245 no se consideran como activos al presentar valores por encima de 40 mN·m⁻¹ (Figura 9).

El análisis a partir de las áreas muestreadas evidenció que el 45% (52/116) de los aislados de aguas adyacentes a los manglares presentaron actividad superficial, mientras para arrecifes y playa correspondió al 31% (53/169) y 39% (42/107) respectivamente.

La síntesis exocelular de estos compuestos permite conocer su actividad superficial por un método directo, rápido y sencillo como la determinación de tensión superficial e interfacial. Estas determinaciones permiten caracterizar los agentes con actividad superficial en detergentes, humectantes, emulgentes, entre otros, de acuerdo al balance hidrófilo lipófilo (BHL) de las moléculas de tensioactivos. Los resultados demostraron que el 63,9% de los cultivos (94/147) que produjeron una disminución significativa la tensión superficial (TS ≤ 35 mN·m⁻¹) son capaces de utilizar los hidrocarburos del petróleo como fuente de carbono y energía.

Existe una gran variedad de microorganismos que producen agentes con actividad superficial al crecer sobre sustratos de diferente naturaleza. En particular, en el medio marino se han descrito diversas especies bacterianas que presentan esta capacidad como *Alcanivorax borkumensis*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Nocardiopsis sp.* *Paracoccus marcusii*,

Pseudoalteromonas agarivorans (Ortiz, 2004; Thavasi *et al.*, 2009; Khopade *et al.* 2012; Ortiz *et al.*, 2014; Antoniou *et al.*, 2015; Karlapudi *et al.*, 2018).

El interés por la búsqueda y obtención de tensioactivos de origen biológico se ha incrementado notablemente por las múltiples aplicaciones que éstos presentan en la industria como detergentes, emulgentes, humectantes, inhibidores de corrosión, entre otras (Banat *et al.*, 2010; Jiménez *et al.*, 2010, Nguyen y Sabatini, 2011). En particular, la utilización de estos tensioactivos biológicos y enzimas específicas como las hidrolasas, lipasas, puede ser de gran interés para favorecer tratamientos biológicos en la remoción y biodegradación de contaminantes (Rigo, 2004; Jiménez *et al.*, 2010; Becerra y Horna, 2016; Karlapudi *et al.*, 2018).

A pesar de que el mecanismo fisiológico de la producción microbiana de tensioactivos a partir de sustratos hidrosolubles no ha sido totalmente esclarecido, se conoce una gran variedad de microorganismos productores en presencia de estas fuentes y ha sido utilizada frecuentemente por la simplicidad del proceso fermentativo y su fácil comercialización (Nguyen y Sabatini, 2011; Sekhon Randhawa y Rahman, 2014). En particular, los cultivos mixtos que producen compuestos tensioactivos en sustratos hidrosolubles ha sido utilizada satisfactoriamente en técnicas de bioaumentación para el tratamiento de ecosistemas impactados por petróleo y sus derivados (Bermúdez *et al.*, 2014).

3.2.3. Actividad hemolítica

La detección de la actividad hemolítica 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.*, 1984; Becerra y Horna, 2016). Este método permite una rápida detección de microorganismos productores de sustancias con actividad superficial (24 h), al compararse con tamizajes basados en vías fermentativas a partir de sustratos hidrófobos, que necesitarían largos períodos de incubación.

La determinación de la actividad hemolítica para los cultivos evaluados demostró que solamente 19 cultivos (4,8%) producían lisis de los glóbulos rojos. Para esta actividad se detectó que fundamentalmente pertenecían al grupo de las bacterias Gram positivas (89,5%, 17/19) y entre estas predominaron los bacilos esporulados.

Teniendo en cuenta el alto porcentaje de cultivos detectados con capacidad de producir tensioactivos y de utilizar el petróleo como fuente de carbono y energía, el criterio de selección a partir de la actividad hemolítica no fue satisfactorio. Este método no se considera definitivo, debido a que algunas enzimas líticas provocan halos de hidrolisis. Por tanto, es recomendable para la detección preliminar y emplear otras técnicas basadas en mediciones de la actividad superficial (Becerra y Horna, 2016).

No obstante, se destaca que el 68,4% (13/19) con actividad hemolítica son capaces crecer en presencia de petróleo, correspondiente a los cultivos CBM-786, CBM-792, CBM-796, CBM-868, CBM-925, CBM-975, CBM-1020, CBM-1029, CBM-1034, CBM-1036, CBM-1104, CBM-1256 y CBM-1311, de los cuales ocho producen compuestos con actividad superficial en sustratos hidrosolubles para un 42,1% (8/19).

La capacidad hemolítica está relacionada con la ruptura de los eritrocitos y consecuente liberación de las moléculas de hemoglobina. Este proceso puede ocurrir por 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. La existencia de cultivos microbianos en colección con actividad hemolítica ofrece la posibilidad de nuevas hemolisinas de uso en la terapéutica, similar a otras citolisinas provenientes de organismos marinos (Kobayashi, 2008; Frazão *et al.*, 2012; Albadry *et al.*, 2014; Bensoussan *et al.*, 2014).

En general, la evaluación de la degradación de fuentes de carbono de diversa naturaleza demostró que más del 90,1% de los cultivos que presentaron esta capacidad se incluyen en el grupo de las bacterias Gram positivas. No obstante, se ha informado una gran variedad de géneros de bacterias Gram positivas y Gram negativas capaces de degradar sustancias tóxicas o difíciles de degradar como los polisacáridos, entre los que se incluyen *Acidovorax*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Cupriavidus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y *Rhodococcus* (Banat *et al.*, 2014; Saavedra *et al.*, 2010; Nguyen y Sabatini, 2011; Vinothini *et al.*, 2015).

Teniendo en cuenta la importancia que reviste la conservación de los ecosistemas marinos, así como la eventual influencia de aportes de origen terrígenos, resulta de interés la detección de microorganismos capaces de asimilar y transformar compuestos que se encuentran con frecuencia en los efluentes vertidos a los ecosistemas.

3.2.4. Producción de enzimas hidrolíticas

Los resultados de la capacidad de producir diferentes enzimas hidrolíticas a partir de los cultivos aislados demostraron un menor porcentaje (69,6%, 273/392) que en la asimilación de diferentes carbohidratos (93,1%). La diversidad de microorganismos que producen exoenzimas en ambientes marinos facilita el proceso de la mineralización completa de compuestos orgánicos en el medio (Raghul *et al.*, 2014).

En general, las bacterias heterótrofas evaluadas presentaron actividad proteolítica, amilolítica y lipolítica, independientemente de la procedencia de las aguas de aislamiento, correspondiendo el mayor número de cultivos positivos a las aguas aledañas a los arrecifes coralinos y manglares (Figura 10).

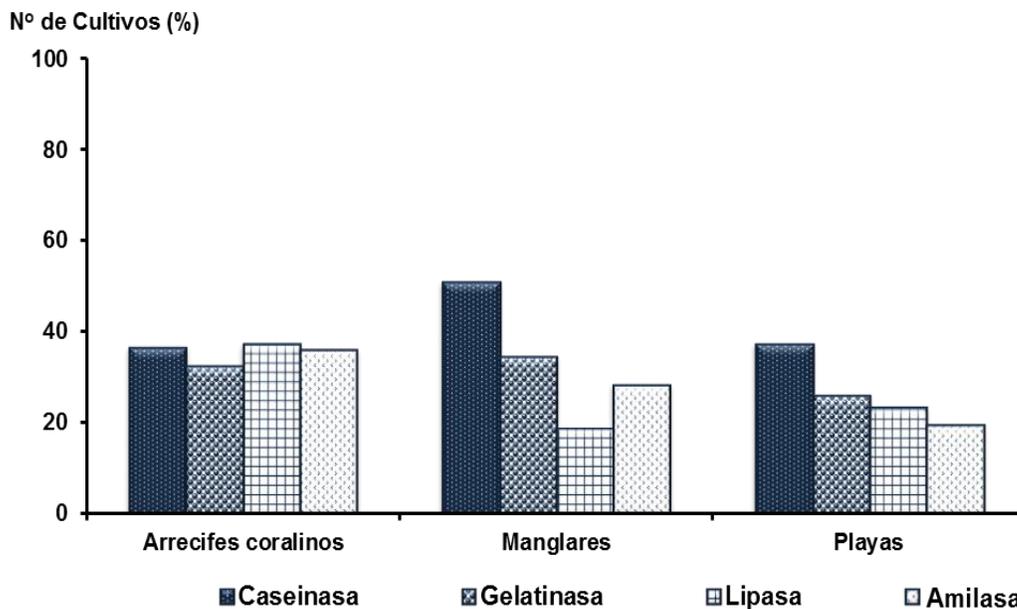


Figura 10. Distribución del porcentaje de bacterias heterótrofas aisladas de agua de mar de diferentes ecosistemas marinos en la excreción de diferentes enzimas hidrolíticas.

El porcentaje de cultivos capaces de producir enzimas hidrolíticas sugiere la presencia de un elevado contenido de materia orgánica en los ecosistemas marinos. En particular, para las áreas de arrecifes se detectó una distribución homogénea para cada actividad enzimática, que evidencia la diversidad metabólica de estos cultivos. Estos resultados deben estar relacionados con la riqueza de nutrientes en los arrecifes coralinos procedentes del metabolismo autotrófico y por la muerte de los organismos de estos ecosistemas con gran biodiversidad (Hoppe *et al.*, 1988; Alcolado *et al.*, 1999). Además, en el caso de los arrecifes del golfo de Cazones y Jardines de la Reina se describe la influencia de las aguas enriquecidas de las plataformas aledañas de los golfos de Batabanó, Ana María y Guacanayabo (Lugioyo y Alfonso 2016; Loza *et al.*, 2017).

Por su parte, los manglares presentan características particulares de contenido de compuestos orgánicos por el aporte autóctono de la macrovegetación y desechos de los organismos bentónicos. Así por ejemplo se ha informado elevados contenidos de nutrientes y materia orgánica en áreas de manglares de Cuba y específicamente en las zonas de manglar sumergido del norte de Guanahacabibes y la Ciénaga de Zapata (González y Aguilar, 2004; Enríquez *et al.*, 2013).

También para las playas aparece descrito la actividad enzimática como mecanismo de filtración establecido en el ecosistema a partir de la carga de materia orgánica de diversa naturaleza que acumula, fundamentalmente de origen antrópico (Perliński y Mudryk, 2016; Astel *et al.*, 2018).

Resulta interesante que de los 65 cultivos que presentan la capacidad de hidrolizar entre tres o cuatro de los sustratos evaluados, el mayor porcentaje corresponde a los aislamientos de aguas adyacentes a los

arrecifes coralinos (52,3%, 34/65); mientras para las aguas de manglares y playas representan el 33,8% (22/65) y 13,8% (9/65) respectivamente.

A partir de la determinación semicuantitativa de la producción de las enzimas caseinasa, amilasa y lipasa se estableció la clasificación de los cultivos positivos según Ong *et al.*, (2011). En particular, se demostró que 98 cultivos presentaron alta actividad enzimática para al menos una de las enzimas hidrolíticas evaluadas, con la formación de halos de hidrolisis >8mm. Debe destacarse que el 45,9% (45/98) y el 35,7 % (35/98) de estos cultivos proceden de las áreas de arrecifes coralinos y manglares respectivamente.

Asimismo, se detectó que predominó una alta (>8 mm) y moderada (>2; ≤8 mm) actividad caseinasa en las aguas de todos los ecosistemas evaluados. Por su parte la actividad amilasa y lipasa presentaron los mayores porcentajes en rangos correspondientes a moderada actividad (>2; ≤8 mm) (Tabla 7).

Tabla 7. Distribución del porcentaje de acuerdo a la clasificación semicuantitativa de la producción enzimática de los aislamientos de agua de mar de diferentes ecosistemas marinos.

Ecosistema	Actividad	Frecuencia de cultivos (%)		
		Baja: ≤2 mm	Moderada: >2; ≤8 mm	Alta: >8 mm
Arrecifes coralinos	Caseinasa	11,3	35,5	53,2
	Lipasa	14,3	65,1	20,6
	Amilasa	32,8	52,5	14,8
Manglares	Caseinasa	3,4	42,4	54,2
	Lipasa	27,3	63,6	9,1
	Amilasa	27,3	60,6	12,1
Playas	Caseinasa	12,5	47,5	40,0
	Lipasa	16,0	76,0	8,0
	Amilasa	33,3	52,4	14,3

Resultados similares refieren Zobell y Upham (1944), quienes identificaron a las bacterias marinas como un grupo de microorganismos con alta actividad proteolítica. Para bacterias marinas de aguas costeras tropicales se ha demostrado la producción de enzimas extracelulares como amilasas y proteasas (Lee *et al.*, 2009). Asimismo, se ha referido la actividad enzimática en muestras de agua de manglares y playas para enzimas hidrolíticas extracelulares como proteasas, lipasas, amilasas, fosfatasa, galactosidasas, entre otras, a través de técnicas dependientes e independientes de cultivos (Mudryk y Podgórska 2006; Gupta *et al.*, 2007; Smriga *et al.*, 2010; Astel *et al.*, 2018).

Estos resultados evidencian la capacidad de degradación microbiana de compuestos orgánicos complejos y difíciles de eliminar en el ecosistema. Además, pueden representar un eslabón importante

en la cadena trófica por su participación en la oxidación de compuestos orgánicos y liberación de los elementos minerales, de manera que constituyen ejes centrales en los ciclos biogeoquímicos de los ecosistemas marinos (Arnosti, 2011; Raghul *et al.*, 2014).

El proceso de mineralización microbiana de la materia orgánica requiere inicialmente de enzimas exocelulares para la hidrólisis a compuestos capaces de difundir a través de las membranas celulares (Arnosti, 2011). La producción constitutiva de estas enzimas es considerada como adaptación a la materia orgánica disponible en los ecosistemas y la medida de la actividad enzimática como indicador de los procesos de transformación de la materia orgánica (Mudryk y Podgórska 2006; Perliński y Mudryk, 2016; Astel *et al.*, 2018). Así por ejemplo la evaluación de la actividad lipolítica ha sido referida como indicador de la degradación de fuentes lipídicas que aportan carbono y energía para los procesos metabólicos de los microorganismos (Hernández-Zulueta *et al.*, 2011; Daouadji *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015).

Estas potencialidades constituyen la base del funcionamiento de los ciclos de nutrientes y la capacidad de resiliencia de los ecosistemas marinos (Das *et al.*, 2006; Zamora *et al.*, 2012). En particular, revisten especial interés, considerando que más del 95% de la materia orgánica disuelta y particulada acumulada en las cuencas hidrográficas incluyen diversas estructuras poliméricas como proteínas, polisacáridos, lípidos, pectina, celulosa, quitina, ácidos nucleicos o lignina (Pamer *et al.*, 2011; Raghul y Bhat, 2011).

A partir de aislamientos de ambientes marinos se ha informado variedad de géneros bacterianos productores de enzimas hidrolíticas, entre los que se incluyen *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Kurthia*, *Staphylococcus* y *Vibrio* (Smriga *et al.*, 2010; Raghul y Bhat, 2011; Raghul *et al.*, 2014; Ramlath *et al.*, 2018). La identificación de estos cultivos representa un potencial de aplicación industrial y biotecnológica. Además, las bacterias aisladas de ambientes marinos resultan de especial interés de acuerdo a las condiciones extremas del medio en que se desarrollan como alta salinidad y baja disponibilidad de oxígeno; de manera que estas enzimas pudieran constituir nuevos productos de aplicación en la industria (Dias *et al.*, 2009; Bharathi *et al.*, 2016; Ramlath *et al.*, 2018).

Las bacterias productoras de proteasas han adquirido especial relevancia, ya que pueden ser utilizadas en diferentes procesos productivos como son la industria de los detergentes, alimentos, clarificación de cerveza y demás bebidas, ablandamiento de carnes rojas, en la industria del cuero y la industria farmacéutica y analítica (Sánchez *et al.*, 2004). Por otra parte la producción de amilasas resulta de interés para la producción de siropes con alto contenido de glucosa, producción de alimentos, cerveza y detergentes, así como las industrias textil y papelera (Khan *et al.*, 2011).

Para el caso de las lipasas de origen microbiano se han desarrollado investigaciones dirigidas a su utilización en tratamientos biológicos de ambientes con alto tenor de lípidos u otros compuestos hidrófobos (Rigo, 2004).

En general, en este estudio se obtuvo un elevado porcentaje de cepas con actividad enzimática, que constituyen un recurso potencial de aplicación en diferentes industrias, pues los procesos de obtención de estas enzimas por vía microbiana resultan sencillos y su rendimiento puede ser incrementado considerablemente actuando sobre los factores del medio de cultivo o modificando el genoma de los microorganismos.

3.2.5. Interacción con fuentes de nitrógeno y fósforo

La diversidad de respuestas en cuanto a la interacción con los compuestos nitrogenados evaluados demostró que el 65,8% (258/392) de los aislados presentaron capacidades metabólicas con al menos uno de los elementos del ciclo del nitrógeno. Estos resultados están relacionados con lo informado en la literatura sobre la funcionalidad de las comunidades microbianas en los ecosistemas marinos para el reciclaje de nutrientes y en particular de su interacción en el ciclo del nitrógeno (Herbert, 1999; Garay, 2003; Hulth *et al.*, 2005; Acuña-González *et al.*, 2006)

Las poblaciones de bacterias relacionadas con el ciclo del nitrógeno son las responsables de las transformaciones de este elemento, participando en procesos oxidativos (nitrificación), reductores (desnitrificación, amonificación, asimilación y fijación de nitrógeno) y combinación de ambos, a partir de vías metabólicas asimilativas y desamilativas de nitrógeno (Hayatsu *et al.*, 2008, Baggs y Philippot, 2011, Ward *et al.*, 2011, Sparacino-Watkins *et al.*, 2014).

La respuesta individual de los aislados en relación con el número de pruebas positivas no fue homogénea, a pesar de que algunos aislados mostraron incluso la potencialidad de fijar nitrógeno, reducción de nitrato y amonificación. Los resultados demostraron que solo el 3,6% (14/392) de los aislados manifestó las tres características.

La caracterización de los aislados demostró que en las aguas de las áreas manglar se detectó un mayor porcentaje de cultivos con capacidades metabólicas relacionadas con el ciclo del nitrógeno (Figura 11). Los manglares son ecosistemas altamente productivos pero generalmente pobres en nitrógeno y fósforo. Esta aparente paradoja puede explicarse a través de un reciclaje efectivo de los nutrientes por la acción de los microorganismos, considerados como la base del funcionamiento, salud y desarrollo de los ecosistemas de manglar (Holguin *et al.*, 2011).

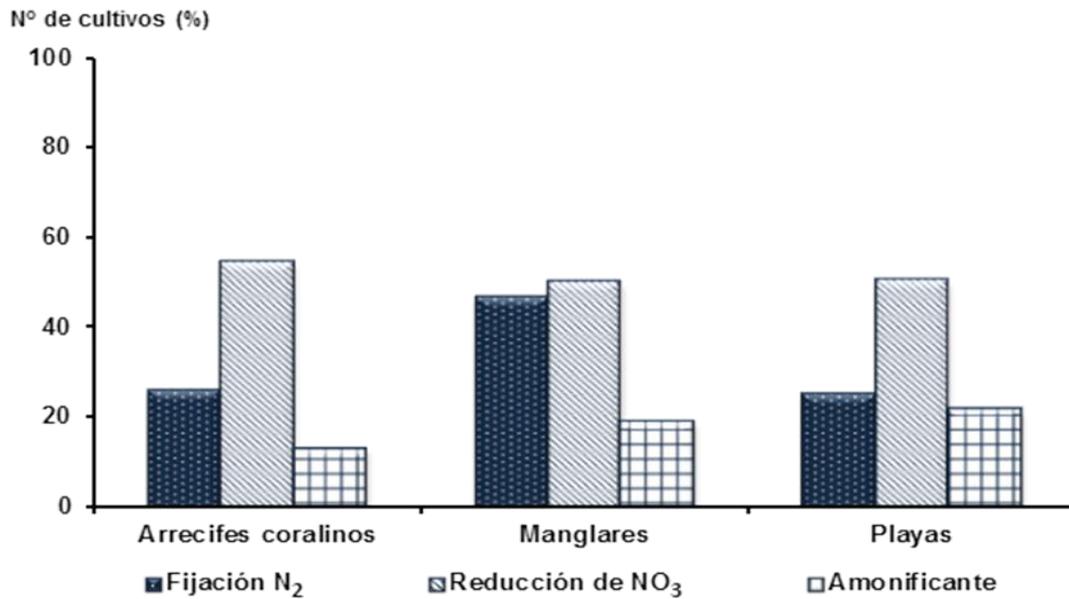


Figura 11. Distribución del porcentaje de bacterias heterótrofas aisladas de agua de mar de diferentes ecosistemas marinos con relación a su interacción con fuentes de nitrógeno.

En el proceso de desnitrificación en los ecosistemas marinos participan una amplia diversidad de géneros bacterianos como *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Flabobacterium*, *Micrococcus*, *Proteus* y *Pseudomonas* (Garay, 2003). Este tipo de procesos resulta fundamental para ambientes que reciben grandes aportes de nitrógeno por fuentes antropogénicas, ya que remueve el exceso de nitrógeno y ayuda al control de la tasa de eutrofización en áreas marinas contaminadas (Garay, 2003). Sin embargo, la reducción de nitrato hasta nitrógeno molecular es un proceso limitado para un grupo escaso de bacterias en la naturaleza, de manera que la reducción parcial origina la formación de NO y N₂O, gases de efecto invernadero liberados a la atmósfera, agravado por el incremento de fuentes de nitrato de origen antrópico (Stein, 2011; Sutton *et al.*, 2011; Correa, 2016).

La diversidad de microorganismos fijadores de nitrógeno o diazotróficos evidencia su presencia tanto en ambientes terrestres como marinos, distribuidos en la mayoría de las divisiones filogenéticas (Masepohl y Klipp, 1996). Los grupos bacterianos característicos como fijadores de nitrógeno comprenden los géneros *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Beijerinckia* (Madigan *et al.*, 2012). También existen referencias de especies del género *Bacillus* que presentan esta actividad en diferentes ambientes como *Bacillus polymixa* (Madigan *et al.*, 2012) y *Bacillus brevis* (Mirabal *et al.*, 2000).

Los estudios de taxonomía polifásica de las bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de fuentes marinas han evidenciado su diversidad filogenética donde se incluyen miembros de los géneros *Azotobacter*, *Desulfuromonas*, *Sphingomonas*, *Geobacter*, *Pseudomonas* y *Bradyrhizobium* (Zhang *et al.*, 2008). Asimismo, se ha demostrado una mayor actividad de fijación de nitrógeno en aquellos ambientes donde

existe acumulación de materia orgánica biodegradable como marismas y manglares, determinado por la estrecha relación entre el proceso de fijación de nitrógeno por acción de bacterias y la presencia de materia orgánica como fuente de energía (Potts, 1984; Holguin *et al.*, 2011).

En relación con el proceso de amonificación en el medio marino se ha descrito la liberación de amonio procedente de la materia orgánica nitrogenada. En particular, se describe por simple reacción de desaminación o por complejos de pasos metabólicos que involucran enzimas hidrolíticas para la conversión de polímeros en subunidades monoméricas. Este proceso juega un papel central en el reciclaje de nitrógeno, fundamentalmente en los sedimentos de ambientes marinos costeros, mediante el cual se garantiza una mayor biodisponibilidad del nitrógeno en estos ecosistemas (Herbert, 1999; Garay, 2003; Hulth *et al.*, 2005; Acuña-González *et al.*, 2006).

A nivel mundial, se ha previsto que la demanda global de fertilizantes crecerá en un 1,5-2% por año hasta el 2020, con tasas de crecimiento anual promedio de 1,3% para N, 2,1% para P y 2,4% para K (www.faostat.3.fao.org., Heffer y Prud'homme, 2015). Esta perspectiva realza la importancia del reciclaje de nutrientes en los ecosistemas marinos, si tenemos en cuenta que un alto contenido de formas reactivas de nitrógeno llegan a los mares y océanos mediante su transporte por las aguas subterráneas y superficiales de los ríos y arroyos (Boyer *et al.*, 2006). Esta situación origina un incremento en la intensidad, extensión y duración de las floraciones de algas por procesos de eutrofización, que provoca degradaciones de hábitats, alteraciones de la cadena trófica y pérdida de biodiversidad (Sutton *et al.*, 2011).

En general, la actividad microbiana de nitrificación/desnitrificación son los principales procesos para la formación y remoción de las especies reactivas de nitrógeno, que debe proporcionar un balance a nivel global. Sin embargo, el incremento de fuentes de nitrato de origen antrópico y su aporte a los ecosistemas es considerado un problema ambiental, donde la caracterización de estos cultivos resulta de interés por su potencial para la remoción sustancias nitrogenadas (Travers, 2007, Sánchez y Sanabria, 2009).

Para la actividad solubilizadora de fosfato solo el 5,1% (20/392) presentaron esta capacidad, lo cual debe estar relacionado con la fuente de aislamiento correspondiente a este estudio (agua de mar). No obstante, los resultados demostraron que 39,1% (135/392) fueron capaces de crecer en las condiciones de cultivo, lo cual evidencian la capacidad de utilizar esta fuente de fósforo no soluble.

La abundancia de cationes en aguas marinas provoca la precipitación del fósforo hacia los sedimentos en forma de óxidos e hidróxidos metálicos no biodisponibles (Broecker y Peng, 1982). La participación de enzimas solubilizadoras de fosfato secretadas por bacterias favorece la asimilación de estos nutrientes por otros organismos, ya que participan en la disolución y mineralización de compuestos

orgánicos de fosfato en el medio marino (Paul y Sinha, 2013, Mujahid *et al.*, 2014). Según Holguin *et al.* (2011) existen pocos estudios sobre este grupo bacteriano en ambientes marinos, aunque se han encontrado tanto en la columna de agua (Seshadri y Ignacimuthu, 2002) como en los sedimentos (Ayyakkannu y Chandramohan, 1971; Kannapiran y Ramkumar, 2011).

La baja frecuencia de microorganismos aislados con una actividad específica pudiera estar relacionado con aspectos restrictivos en ambientes particulares, donde determinadas especies de microorganismos requieren de otros organismos para su protección, provisión del sustrato; así como las propiedades físicas y químicas particulares del ambiente y los métodos de aislamiento empleados (Salgado *et al.*, 2012).

Así por ejemplo, los estudios realizados por Enríquez *et al.* (2013) en las áreas de la Ciénaga de Zapata y de Loza *et al.* (2017) en los arrecifes del archipiélago Jardines de la Reina y golfo de Cazones demostraron que los valores de concentración de iones fosfato y fósforo total en agua no excedían de $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0,79 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente. Estas concentraciones evidencian condiciones oligotróficas de nutrientes de acuerdo al índice de estado trófico propuesto por Martínez *et al.* (2004) para iones fosfato y fósforo total en aguas de la zona marino costera de Cuba. Estas condiciones podrían explicar la baja frecuencia de detección de microorganismos solubilizadores de fosfatos.

No obstante, resulta interesante que 85% (17/20) de los aislados con actividad solubilizadora de fosfato presentaron capacidades metabólicas relacionadas con el ciclo del nitrógeno, de ellas el 47% (8/17) realizan fijación de nitrógeno, en correspondencia con lo referido por otros autores (Richardson *et al.*, 2002; Ardila, 2006).

Entre los géneros informados como solubilizadores de fosfatos aislados de ambientes marinos se incluyen *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Alcaligen*, *Vibrio*, *Flavobacterium* (Seshadri y Ignacimuthu, 2002).

3.2.6. Ensayo de susceptibilidad antibiótica

Los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana para los extractos obtenidos de las bacterias aisladas de agua de mar demostraron que 23 cultivos (5,9%) producen metabolitos capaces de inhibir el crecimiento de al menos una de las cepas de referencia evaluada (Figura 12).

La actividad antimicrobiana se detectó solo frente bacterias Gram positivas, en particular se detectó que 21 cepas resultaron positivas frente a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y cuatro cepas frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6533. Asimismo, dos cultivos presentaron actividad frente a ambas especies, correspondientes a CBM-1031 y CBM-1035 (Figura 12).

Resulta interesante encontrar que el 74% (17/23) de los aislados que presentaron esta actividad se corresponde con bacterias Gram positivas, de las cuales 41,2% (7/17) son esporuladas.

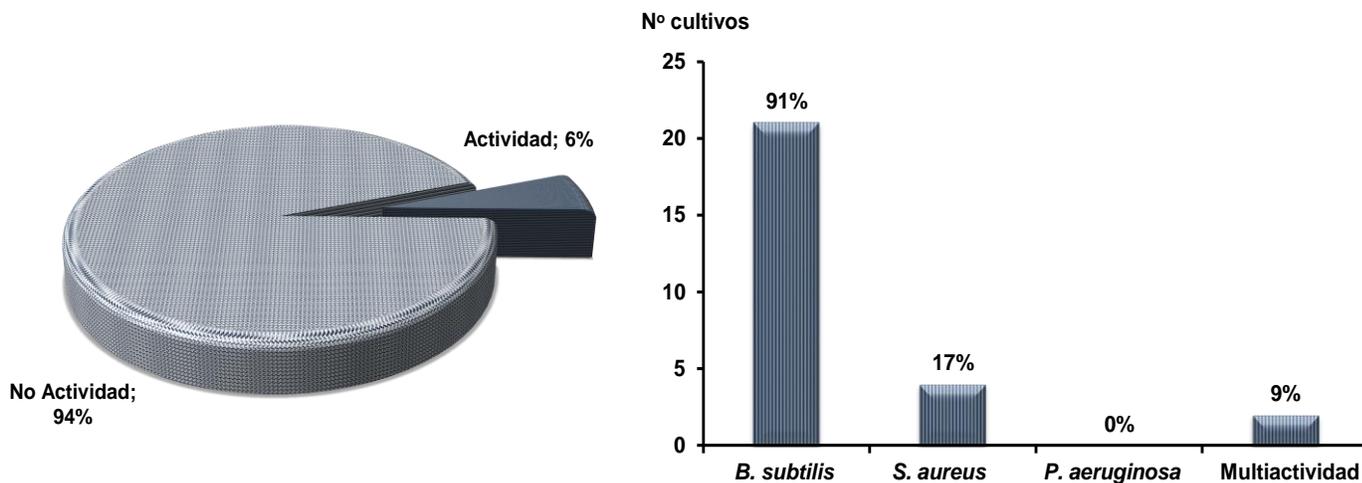


Figura 12. Actividad antimicrobiana de los 392 extractos exocelulares concentrados frente a las cepas de referencia *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6533 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Las bacterias Gram positivas del medio terrestre y marino aparecen referidos como productoras de metabolitos secundarios biológicamente activos (Águila, 2012; Satheesh *et al.*, 2012). En estos microorganismos se ha demostrado que más del 3% de su genoma contiene genes que codifican para la biosíntesis de metabolitos como policétido sintasas y péptido sintetasa no ribosomal requeridos para la biosíntesis de compuestos activos (Donadio *et al.*, 2007). En particular, las bacterias del género *Bacillus* aparecen descritas como uno de los grupos de microorganismos de alto potencial farmacológico (Muscholl-Silberhorn *et al.*, 2008, Santos *et al.*, 2010). Las especies *B. brevis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, y *B. subtilis* aislados de diferentes sustratos de origen marino producen metabolitos secundarios con propiedades antagonistas y han sido exitosos como agentes biocontroladores (Madigan *et al.*, 2005; Nair *et al.*, 2012).

La cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 mostró resistencia ante los posibles compuestos bioactivos de los extractos evaluados. Esto pudiera estar atribuido a que las bacterias Gram negativas presentan fuertes mecanismos de defensa como: presencia de β - lactamasas, alteraciones de la permeabilidad de la membrana dada por bombas de expulsión y las mutaciones de las porinas transmembranales, que le confieren un amplio grado de resistencia y constituyen una barrera eficaz al paso de moléculas de diferente naturaleza (Águila, 2012).

En general los resultados mostraron baja incidencia de actividad antimicrobiana en los aislados, coincidiendo con otras investigaciones a partir de bacterias de origen marino (Fábregas *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 2010). Sin embargo, es reconocido que las interacciones antagónicas de tipo bacteria-bacteria que involucran inhibición del crecimiento, corresponden a un mecanismo que puede ayudar a

mantener la composición de especies bacterianas a nivel de micro escala, ya sea mediante la competencia por nutrientes, espacio, luz y/o a través de la producción de diversos metabolitos secundarios, entre ellos sustancias antibacterianas (Bowman, 2007, Águila, 2012).

En los últimos años la creciente resistencia de los microorganismos causantes de enfermedades infecciosas a los antibióticos comerciales comúnmente empleados; así como los efectos tóxicos asociados a estos, exige la búsqueda de nuevos medicamentos y con ello la exploración de ambientes tradicionalmente no explotados para tales fines, como es precisamente el medio marino (Blunt *et al.* 2003, Usama, 2010, Glöckner *et al.* 2012).

Las investigaciones relacionadas con el aislamiento de microorganismos en diferentes ecosistemas marinos de Cuba permiten incrementar el conocimiento de la diversidad microbiana; el cual no solo está determinado por la variedad de géneros y especies que la conforman sino también por la amplia versatilidad metabólica que presentan los microorganismos para adaptarse a condiciones extremas y la síntesis de metabolitos de interés.

Los resultados de las capacidades y potencialidades de los cultivos recién incorporados a la colección demostraron que el 99,7% presentaron al menos una actividad de interés para la biomedicina, la industria o el saneamiento ambiental. En particular, 209 cultivos presentaron entre cuatro y siete de las bioactividades consideradas en este estudio. Estos resultados evidencian el potencial de la colección y la importancia de la conservación *ex situ* para garantizar su disponibilidad con fines biotecnológicos en diferentes esferas.

Los resultados de este proyecto se corresponden con la tendencia actual de incrementar las investigaciones relacionadas con la búsqueda de sustancias de interés a partir de microorganismos marinos.

En general las bacterias heterótrofas aisladas presentaron gran diversidad de potencialidades, aunque debe señalarse que su distribución de acuerdo a los grupos morfotintoriales no fue similar para cada actividad evaluada. En la Tabla 8 aparece relacionado el número de aislamientos que presentaron respuestas positivas a las evaluaciones realizadas y sus características tintoriales.

La relación de bacterias con actividad pertenecientes al grupo de las Gram positivas fue superior a las Gram negativas para cada una de las bioactividades, con excepción de la producción de agentes con actividad superficial y antimicrobianos. No obstante, debe destacarse que la cantidad de aislamientos Gram positivos en este estudio (323) fue superior a los Gram negativos (69).

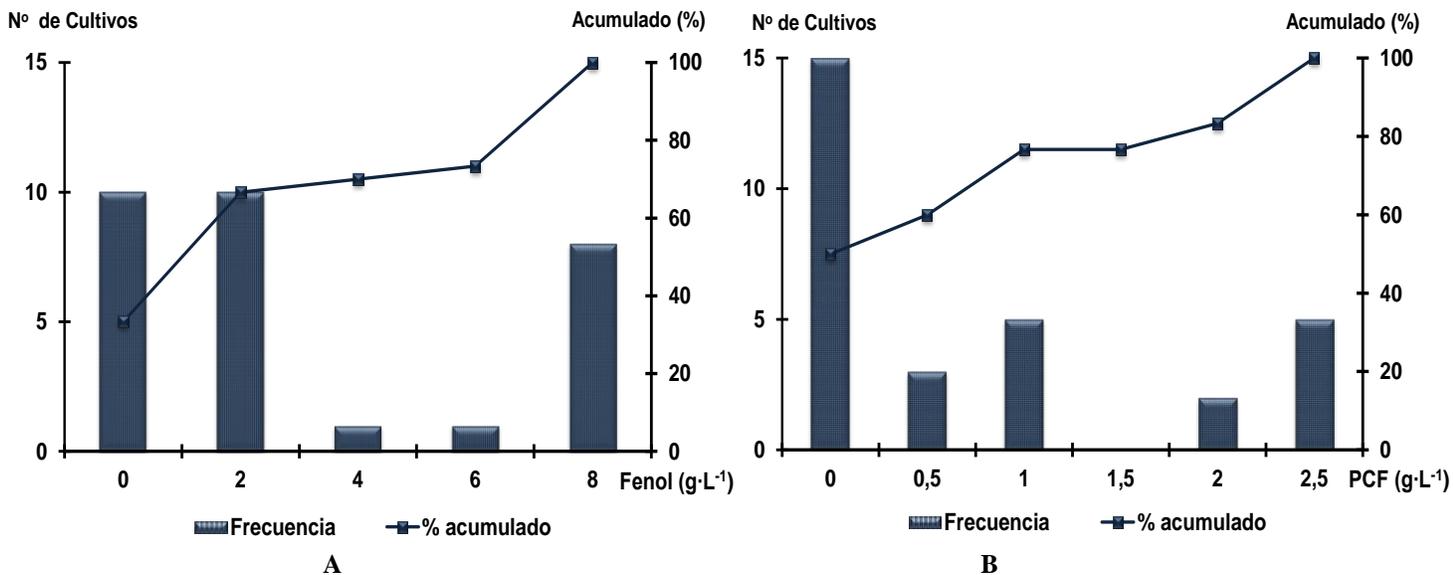


Figura 13. Distribución de las bacterias heterótrofas según los rangos de clase para las concentraciones de fenol (A) y pentaclorofenol (PCF) (B) en la determinación de la concentración mínima inhibitoria.

Los resultados demostraron que el 66,7% (20/30) de los cultivos evaluados presentaron diferentes categorías de resistencia al fenol, mientras en presencia de pentaclorofenol disminuye el porcentaje de cepas resistentes a diferentes concentraciones. El 50% de los aislados evaluados no toleraron la presencia de pentaclorofenol; determinado por una mayor complejidad estructural con respecto al fenol.

El análisis de estadística descriptiva demostró que ocho de las cepas estudiadas (26,7%) se incluyeron en el rango de clase correspondiente hasta 8 000 ppm de fenol, el cual representa el máximo valor de CMI determinado bajo las condiciones de estudio. Para este rango se corresponden los cultivos de CBM-970, CBM-977, CBM-989, CBM-990, CBM-1029, CBM-1034, CBM-1035 y CBM-1036. Asimismo la cepa CBM-1255 y CBM-1301 presentaron concentraciones de tolerancia de hasta 4 000 y 6 000 ppm de fenol respectivamente. Todos los cultivos pertenecen al grupo de las bacterias Gram positivas.

Para el pentaclorofenol se demostró el 6,7% de los cultivos (2/30) presentaron valores de resistencia de hasta 2 000 ppm, mientras cinco cultivos (16,7%) alcanzaron valores de hasta 2 500 ppm, correspondiente a las cepas CBM-970, CBM-977, CBM-989, CBM-990 y CBM-1029.

La persistencia de los organoclorados en el ambiente superan las concentraciones máximas permisibles para el ambiente. Países desarrollados informan niveles de descargas en los residuales domésticos y de las industrias de la madera o fabricación de papel de hasta 6 ppm (Canadá); 150 ppm (Estados Unidos) y 0,7ppm (Alemania); los cuales se corresponden con niveles superiores a las disposiciones sobre las concentraciones permisibles para proteger la salud humana y el entorno (Suárez, 2004). Al comparar

los valores de CMI de las cepas evaluadas con los niveles de persistencia de estos compuestos en el ambiente, sugieren la posibilidad de ser evaluados en procesos de degradación de compuestos organoclorados y constituyen la base del desarrollo de investigaciones dirigida al saneamiento y recuperación de ambientes naturales contaminados.

En numerosos trabajos se ha demostrado que los máximos valores de CMI están relacionados con fuentes de aislamiento de zonas impactadas, donde la contaminación por compuestos fenólicos persistentes ha sido prolongada y ha permitido el desarrollo de microorganismos que poseen un elevado potencial de resistencia y degradación a los mismos (Suárez, 2004).

Sin embargo en el presente trabajo se encontraron microorganismos con valores de CMI entre 4 000-8 000 ppm de fenol o 2 000-2 500 ppm de pentaclorofenol en aislados de aguas alejadas de disturbios antrópicos, como las cepas CBM-1029, CBM-1034, CBM-1035, CBM-1036, CBM-1255 y CBM-1301. Estas capacidades pudieran estar relacionadas con mecanismos alternativos desarrollados por los microorganismos de esos ambientes para la supervivencia bajo condiciones extremas.

Los cultivos seleccionados para continuar la evaluación de la degradación de diferentes compuestos persistentes fueron CBM-970, CBM-977, CBM-989, CBM-990, CBM-1029, CBM-1034, CBM-1035, CBM-1036, CBM-1255 y CBM-1301.

3.3.2. Degradación de compuestos xenobióticos a escala de zaranda

En la Figura 14 se muestran los perfiles de crecimiento para cinco de los cultivos seleccionadas de acuerdo a los valores de CMI de compuestos fenólicos. El comportamiento del crecimiento celular de los cultivos CBM-977, CBM-990, CBM-1034, CBM-1035 y CBM-1036 demostró las variaciones de las concentraciones de biomasa en el tiempo y sugieren la posibilidad del uso fenol por vía asimilativa como fuente carbono y energía.

Estas variaciones de concentración de biomasa describen las diferentes fases del crecimiento de los cultivos seleccionados. Para las cepas CBM-977, CBM-990, CBM-1034 y CBM-1036 no fue detectada la fase de latencia en las condiciones experimentales, sólo se evidencia desde el inicio el crecimiento exponencial de estos microorganismos.

La fase exponencial de los cultivos en presencia de fenol se extendió hasta las 20 h, con excepción de la CBM-990 y CBM-1035 que duró hasta las 15 y 35 h respectivamente. En esta fase la célula utiliza los nutrientes para el incremento de la biomasa, el crecimiento es balanceado y se mantiene constante el valor de la velocidad específica de crecimiento (μ).

En la fase de aceleración negativa el crecimiento está en función de la concentración de sustrato y se acumulan las sustancias de reserva, debido al consumo de algún nutriente limitante y por tanto las condiciones ambientales son adversas para la célula; de este modo la velocidad específica de

crecimiento disminuye hasta hacerse nula. Posteriormente se alcanzó la fase estacionaria, la cual se prolongó hasta el final del experimento. En este período ocurre el metabolismo endógeno de las células a expensas de las sustancias acumuladas en la fase anterior.

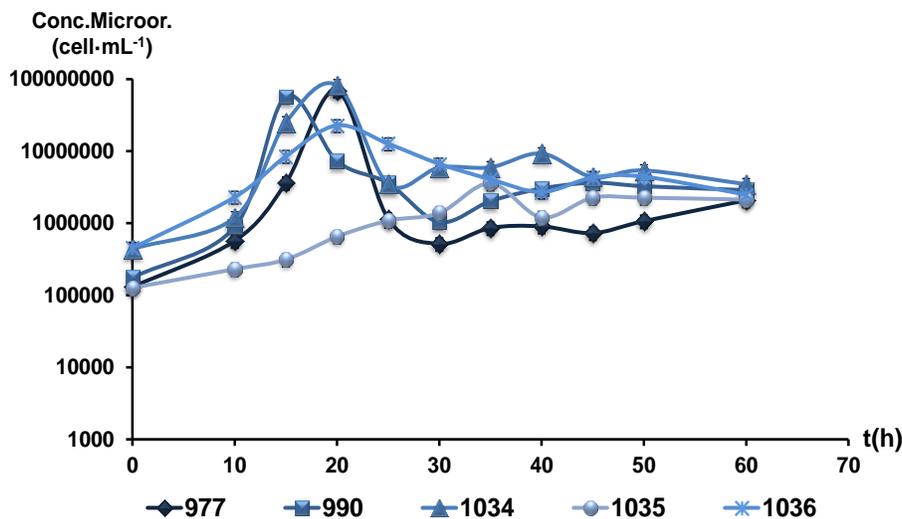


Figura 14. Perfil de fermentación promedio de las cepas CBM-990, CBM-977, CBM-1034, CBM-1035 y CBX-1036 en el medio de cultivo Vela y Ralston (1978), utilizando el fenol como fuente de carbono y energía a 125 r min^{-1} , $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Los valores de μ y de productividad alcanzados durante el crecimiento celular demostraron diferencias significativas de estos parámetros cinéticos y de eficiencia respectivamente entre las bacterias heterótrofas seleccionadas para la degradación de compuestos fenólicos (Tabla 9).

Tabla 9. Valores de velocidad específica de crecimiento (μ) productividad (Pr), concentración de fenol final (C_{Ff}) y porcentaje de remoción de fenol (R_F) para las cepas seleccionadas durante la fermentación en el medio de cultivo Vela y Ralston (1978), utilizando el fenol ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) como fuente de carbono y energía a 125 r min^{-1} , $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ (Duncan, $p < 0,05$).

Cepas	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Pr (cell·mL ⁻¹ ·h ⁻¹)	$C_{Ff} \text{ (g} \cdot \text{mL}^{-1}\text{)}$	$R_F \text{ (%)}$
CBM-977	$0,1124^c \pm 0,007$	$3,5 \cdot 10^{6a} \pm 1,9 \cdot 10^3$	$529,4^b \pm 25,1$	47,1
CBM-990	$0,2000^a \pm 0,009$	$3,8 \cdot 10^{6a} \pm 1,9 \cdot 10^3$	$398,2^c \pm 25,1$	60,2
CBM-1034	$0,1718^b \pm 0,001$	$4,1 \cdot 10^{6a} \pm 2,0 \cdot 10^3$	$546,3^b \pm 25,1$	45,4
CBM-1035	$0,1194^c \pm 0,006$	$9,8 \cdot 10^{4b} \pm 3,1 \cdot 10^2$	$647,2^a \pm 25,1$	35,3
CBM-1036	$0,1821^b \pm 0,005$	$1,1 \cdot 10^{6a} \pm 1,1 \cdot 10^3$	$505,3^b \pm 25,1$	49,5

El análisis de los parámetros cinéticos durante el crecimiento en fenol en las condiciones experimentales demostró que las cepas CBM-990, CBM-1034 y CBM-1036 alcanzaron valores significativamente superiores de μ con respecto a CBM-977 y CBM-1035, siendo la de mayor significación el cultivo de CBM-990. Por su parte la productividad de biomasa fue similar estadísticamente para todos los cultivos, con excepción de CBM-1035 que fue significativamente

inferior. El análisis del crecimiento y productividad evidencian el empleo del fenol por vía asimilativa en los cinco cultivos para las condiciones de trabajo; que permiten el crecimiento celular a partir de estos compuestos como únicas fuentes de carbono y energía

Los porcentajes de remoción indican una disminución de la concentración de fenol con respecto al inicio de la experiencia ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). En particular, la cepa CBM-990 presentó el mayor porcentaje de remoción de las cepas evaluadas.

Resultados similares de crecimiento microbiano en compuestos fenólicos han sido descritos a partir de tres cepas de *Bacillus* aisladas de ambientes impactados (Karn *et al.*, 2010). Estos autores demostraron diferencias significativas en el incremento de la biomasa en el tiempo en presencia de pentaclorofenol como única fuente de carbono y energía para cultivos de las especies *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus thuringensis*; así como la degradación de más del 90% del compuesto fenólico al cabo de las 168 h.

Los estudios de cinética de degradación para microorganismos degradadores de petróleo se han basado en la evaluación de hidrocarburos representativos de las diferentes componentes del petróleo, ya que permiten establecer los posibles mecanismos de oxidación de una forma más sencilla. Los hidrocarburos seleccionados se encuentran entre los más comunes para los petróleos cubanos (Joseph, 1996).

En la Figura 15 se muestran los perfiles de crecimiento en diferentes hidrocarburos del petróleo de tres de los cultivos seleccionados de acuerdo a las capacidades metabólicas para degradar todas las fuentes de carbono evaluadas, actividad lipolítica y producción de tensioactivos. El comportamiento del crecimiento celular de los cultivos CBM-990, CBM-1255 y CBM-1301 demostraron las variaciones de las concentraciones de biomasa en el tiempo en correspondencia con las diferentes fases del crecimiento microbiano.

Los resultados demuestran un incremento gradual de la concentración celular en el tiempo; que sugieren la posibilidad del uso de los hidrocarburos evaluados por vía asimilativa como fuente carbono y energía. En particular, se detectaron incrementos de biomasa de hasta tres órdenes de concentración de acuerdo a las particularidades de cada cepa frente a un sustrato determinado.

La fase exponencial de los cultivos CBM-990 y CBM-1301 en presencia de todos los hidrocarburos evaluados se extendió hasta las 48 h, al igual que para CBM-1255 en n-hexadecano. Para ese cultivo (CBM-1255) en ciclohexano y naftaleno el período exponencial duró hasta las 72 h, mientras en fenantreno fue hasta las 96 h. El resto de las etapas de crecimiento se comportan de manera similar para todos los cultivos en los diferentes sustratos, donde se observa una fase estacionaria que se abarca hasta finalizada la experiencia.

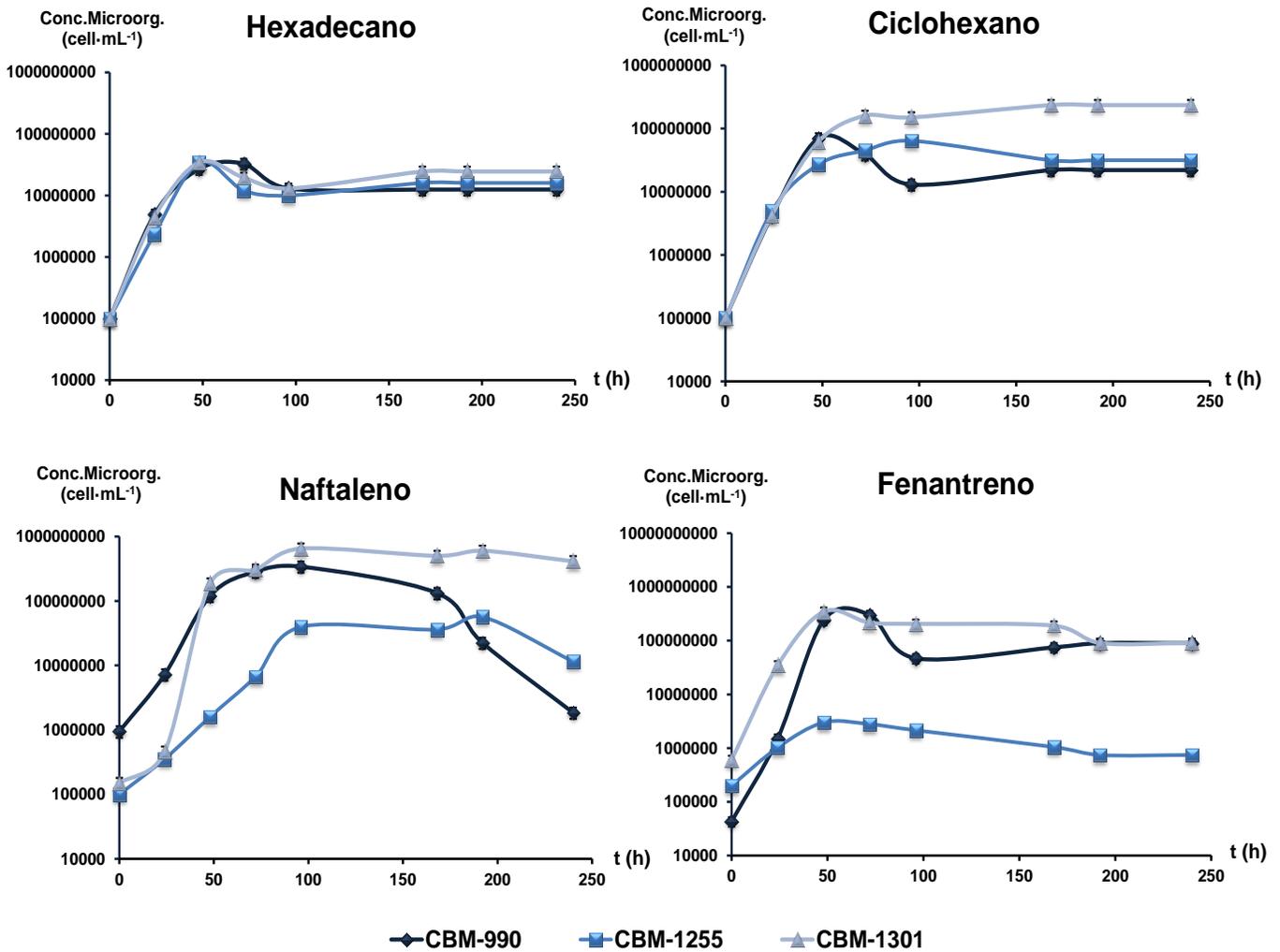


Figura 15. Perfil de fermentación promedio de las cepas CBM-990, CBM-1255 y CBX-1301 en el medio de cultivo Vela y Ralston (1978), utilizando hidrocarburos del petróleo como fuente de carbono y energía a 125 r min^{-1} , $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

La determinación de los parámetros de velocidad específica de crecimiento y de productividad durante el crecimiento celular frente a n-hexadecano, ciclohexano, naftaleno y fenantreno demostró diferencias significativas entre los cultivos y entre los hidrocarburos en iguales condiciones de cultivo (Tabla 10). En general, el comportamiento de la velocidad específica de crecimiento (μ) para el cultivo CBM-1301 frente a los cuatro hidrocarburos evaluados no presentó diferencias significativas. Estos valores son estadísticamente similares a los máximos valores de μ obtenidos en los cultivos de CBM-990 (n-hexadecano y ciclohexano) y CBM-1255 (n-hexadecano). Asimismo, se demostró que los valores de μ para estas cepas (CBM-990 y CBM-1255) frente a compuestos aromáticos como el naftaleno y fenantreno, presentaron valores significativamente inferiores con respecto a los hidrocarburos saturados (n-hexadecano y ciclohexano).

Tabla 10. Valores de velocidad específica de crecimiento (μ) y productividad (Pr) para las cepas seleccionadas durante la fermentación en el medio de cultivo Vela y Ralston (1978), utilizando diferentes hidrocarburos ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) como fuente de carbono y energía a 125 r min^{-1} , $30\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ (Duncan, $p<0,05$).

Cepas	Hidrocarburos	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Pr ($\text{cell}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
CBM-990	n-Hexadecano	$0,0766^a \pm 0,002$	$5,6\cdot 10^{5b} \pm 7,2\cdot 10^2$
	Ciclohexano	$0,0767^a \pm 0,003$	$1,5\cdot 10^{6a} \pm 1,2\cdot 10^3$
	Naftleno	$0,0660^b \pm 0,003$	$3,9\cdot 10^{6a} \pm 2,0\cdot 10^3$
	Fenantreno	$0,0581^c \pm 0,001$	$5,0\cdot 10^{6a} \pm 2,6\cdot 10^3$
CBM-1255	n-Hexadecano	$0,0745^a \pm 0,001$	$7,1\cdot 10^{5b} \pm 8,4\cdot 10^2$
	Ciclohexano	$0,0683^b \pm 0,003$	$6,7\cdot 10^{5b} \pm 8,2\cdot 10^2$
	Naftleno	$0,0546^c \pm 0,002$	$4,1\cdot 10^{5b} \pm 6,4\cdot 10^2$
	Fenantreno	$0,0486^d \pm 0,002$	$5,8\cdot 10^{4c} \pm 2,4\cdot 10^2$
CBM-1301	n-Hexadecano	$0,0719^a \pm 0,001$	$7,2\cdot 10^{5b} \pm 8,5\cdot 10^2$
	Ciclohexano	$0,0758^a \pm 0,001$	$2,4\cdot 10^{6a} \pm 1,6\cdot 10^3$
	Naftleno	$0,0717^a \pm 0,001$	$6,8\cdot 10^{6a} \pm 2,6\cdot 10^3$
	Fenantreno	$0,0743^a \pm 0,009$	$7,2\cdot 10^{6a} \pm 2,7\cdot 10^3$

El análisis de los valores de productividad de biomasa se corresponde con los incrementos del crecimiento celular para cada hidrocarburo, que evidencian el empleo de estos sustratos por vía asimilativa como únicas fuentes de carbono y energía. No obstante, resulta interesante que para una misma cepa este parámetro difiera significativamente en al menos uno de los hidrocarburos utilizados independientemente de la complejidad del sustrato.

Estos resultados demuestran la particularidad del comportamiento de los microorganismos frente a un mismo sustrato; determinado por diferentes factores como la afinidad por sustrato, inhibición del crecimiento por algún nutriente limitante, entre otros (Cabranes *et al.*, 2006). En particular, las evaluaciones de degradación evidencian una estrecha relación con la complejidad de los sustratos, condiciones de nutrientes, oxigenación, pH, temperatura, entre otros (Geetha *et al.*, 2013); así como la eficiencia y naturaleza de los tensioactivos sintetizados a partir de esas fuentes de carbono (Borah y Yadav, 2017). Estos autores demostraron el incremento de la biomasa en el tiempo en presencia de hidrocarburos como única fuente de carbono y energía para una cepa de la especie *Bacillus cereus*; así como la producción de un compuesto con potencialidades de emulsificante.

A partir de los resultados de velocidad específica de crecimiento y productividad en los diferentes hidrocarburos fueron seleccionados los cultivos CBM-990 y CBM-1301 para los estudios de degradación.

Las evaluaciones de degradación de los hidrocarburos mediante la técnica de Espectroscopía Infrarroja demostraron las variaciones de los espectros a diferentes tiempos. En la Figura 16 se muestra el perfil del solvente de extracción de la fase orgánica de las muestras a evaluar.

Se obtuvieron perfiles de absorción por Espectroscopía Infrarroja a las 0 y 250 h para el cultivo CBM-990 en n-hexadecano y ciclohexano, así como de CBM-1301 para naftaleno (Tablas 11, 12 y 13, Figuras 17, 18 y 19).

Tabla 11. Bandas de absorción que aparecen en los espectros IR de las fases orgánicas durante la degradación de n-hexadecano y ciclohexano por la cepa CBM-990.

Hidrocarburos	Tiempo (h)	Vibraciones	Frecuencia (cm ⁻¹)
n-hexadecano	0	CH ₃ (ν)	2960
		CH ₂ (ν)	2850
		CH ₂ (δ)	1470
		CH ₃ (δ)	1380
	250	C=O (ν) aldehídos saturados o cetonas	1720-1740
		OH (δ) alcoholes	1420
		C=O (ν) ácidos carboxílicos	1690-1720
		Ésteres de acetato	1242
ciclohexano	0	CH ₂ (ν)	3492
		CH ₂ (ν)	2927
		CH ₂ (ν)	2861
		CH ₂ (δ)	2361
		CH ₂ (δ)	2330
	250	C=O (ν) aldehídos saturados	1650-1740
		OH (δ) alcoholes primario	900-1100, 1420
		C=O (ν) ácidos carboxílicos	877, 1250

Los resultados para la evaluación de la degradación del n-hexadecano indican que a tiempo 0 h se identificaron compuesto formado por grupos CH₃ y CH₂, coincidiendo con la estructura del n-hexadecano. Asimismo para el ciclohexano se detectaron inicialmente grupos CH₂ que concuerda con la estructura del ciclohexano (Pasto y Johnson, 1980).

A las 250 h de interacción del microorganismo con el n-hexadecano se observó una disminución de las bandas que se encuentran cercanas a 3000 y 1420 cm⁻¹, que evidencian la degradación del hidrocarburo (Figura 17). Además, aparecen nuevas bandas e incremento de algunas alrededor de los 1720-1740, 1690-1720, 1650, 1420 y 1242 cm⁻¹ (Figura 17), que deben estar relacionadas con la formación de compuestos intermediarios de la oxidación del n-hexadecano.

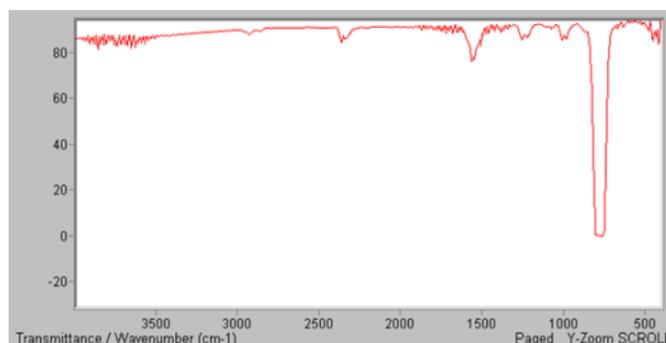


Figura 16. Espectros FTIR del tetracloruro de carbono.

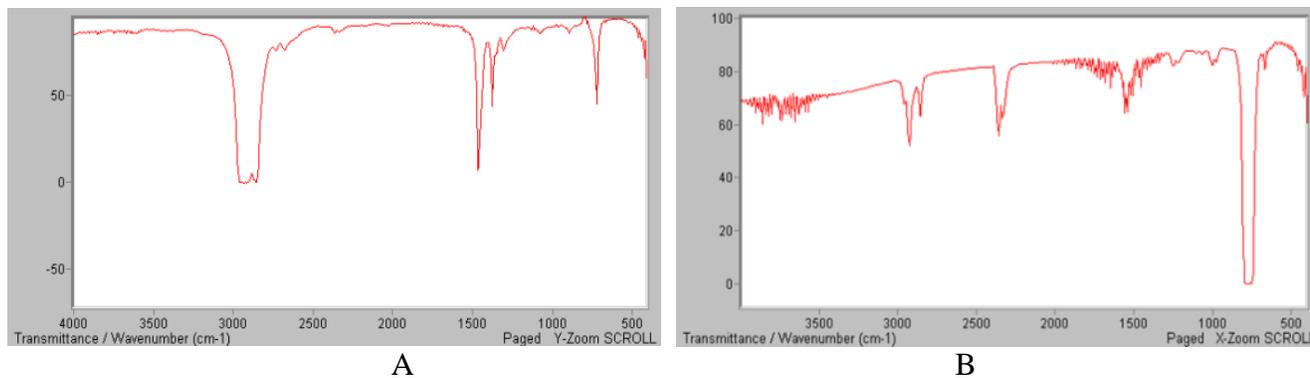


Figura 17. Espectros FTIR del n-hexadecano (A) y la oxidación del compuesto a las 250 h de contacto con la cepa CBM-990 (B) en el medio de cultivo Vela y Ralston (1978), a 125 r min^{-1} , $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

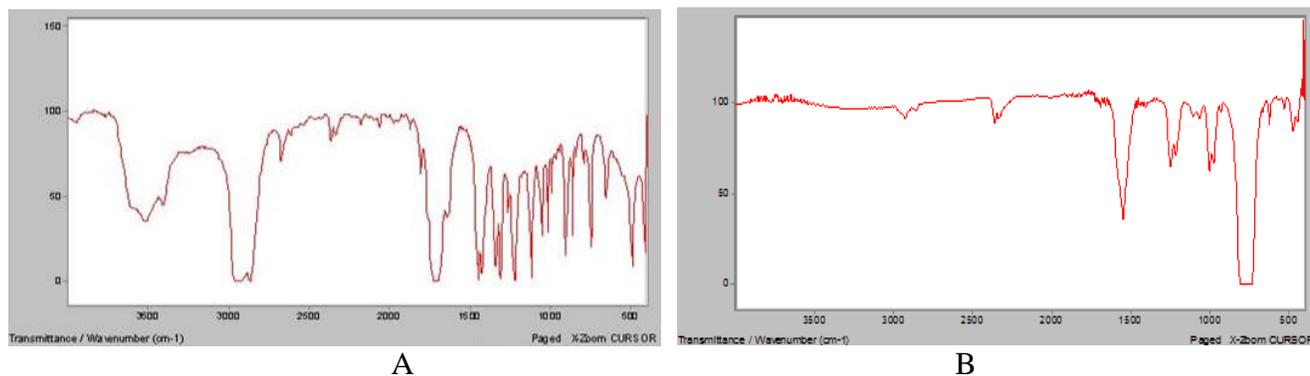


Figura 18. Espectros FTIR del ciclohexano (A) y la oxidación del compuesto a las 250 h de contacto con la cepa CBM-990 (B) en el medio de cultivo Vela y Ralston (1978), a 125 r min^{-1} , $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

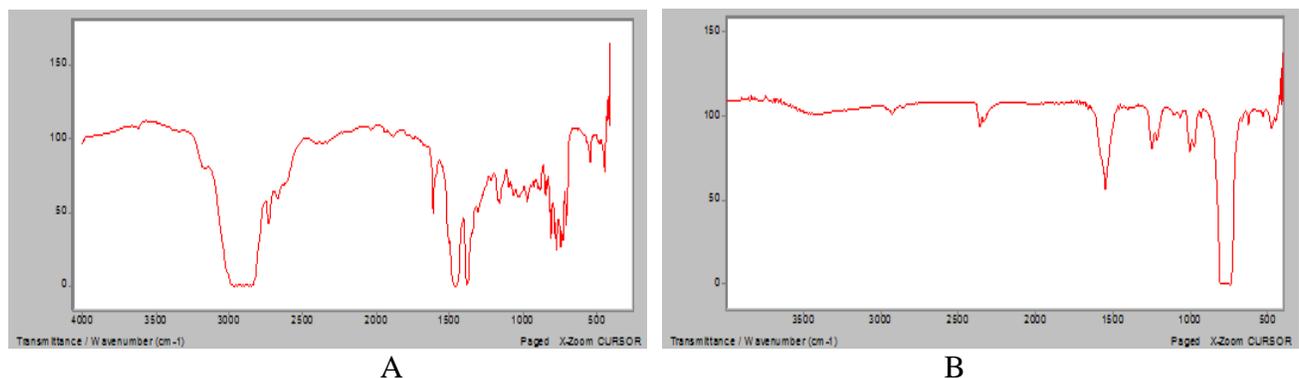


Figura 19. Espectros FTIR del naftaleno (A) y la oxidación del compuesto a las 250 h de contacto con la cepa CBM-1301 (B) en el medio de cultivo Vela y Ralston (1978), a 125 r min^{-1} , $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Al comparar las bandas de absorción del espectro IR de la 0 h con respecto a la de 250 h de degradación del ciclohexano por CBM-990 (Tabla 11 y Figura 18), se apreció una disminución de las bandas correspondientes a los intervalos 3400-3600, 2800-2900 y 1600-1700 cm^{-1} , lo que evidenció el consumo del ciclohexano por el microorganismo. Además, como se muestra en la Tabla 11, aparecieron un conjunto de bandas bien definidas que deben estar relacionadas con procesos de conversión del ciclohexano en otros productos de oxidación por esta bacteria (Figura 18).

Las bandas de absorción reflejadas en los IR durante el proceso de degradación del naftaleno a las 0 y 250 h por la cepa CBM-1301 se presentan en la Tabla 12. Las vibraciones observadas en el tiempo cero, indicaron la presencia de compuestos aromáticos, que coinciden con las estructuras del naftaleno (Pasto y Johnson, 1980).

Tabla 12. Bandas de absorción observadas en los espectros IR de las fases orgánicas durante la degradación de naftaleno por la cepa CBM-1301.

Hydrocarburos	Tiempo (h)	Vibraciones	Frecuencia (cm^{-1})
Naftaleno	0	CH ₂ (v) y CH	2800-3000
		CH ₂ Aromáticos	700-750
	250	Benceno bisustituido	1600
		OH (δ) alcoholes aromáticos	1205-1301
		Aldehído aromático	1301, 1675, 1701
		C=O (v) ácidos carboxílicos	1000, 1600

A las 250 h de interacción de la cepa CBM-1301 con el naftaleno como única fuente de carbono, se apreció una disminución de las bandas correspondientes al intervalo de 2800 a los 3000 cm^{-1} , que evidencia procesos de biodegradación de este compuesto (Tabla 12). Además, se observa el surgimiento de nuevas bandas, que evidencian la aparición de metabolitos cuyos grupos funcionales absorben 1600, 1205-1301, 1675, 1701, 1000 cm^{-1} (Tabla 12, Figura 19).

Estos resultados evidencian la degradación de compuestos de las diferentes fracciones del petróleo por acción de los microorganismos evaluados. Resultados similares fueron descritos para un cultivo de *Bacillus alcalophilus*, aislados de sedimentos marinos, capaz de oxidar n-hexadecano, el ciclohexano, el naftaleno y el fenantreno como única fuente de carbono y energía, mediante mecanismos de metil y β -oxidación (Cabranes, 2005; Cabranes *et al.*, 2006).

La eficiencia en la degradación de compuestos orgánicos persistentes puede estar determinada por las condiciones de cultivo, así para un mismo microorganismo los porcentajes de remoción pudieran ser diferentes en presencia de un mismo compuesto bajo condiciones experimentales distintas (Jackson y Pardue, 1999; Geetha *et al.*, 2013; Ebadi *et al.*, 2017). Es por ello que el éxito en el proceso de

biodegradación requiere de estudios indispensables relacionados con la caracterización fisiológica y metabólica (Ahmad *et al.*, 1991; Antoniou *et al.*, 2015); así como evaluaciones ecológicas del proceso de degradación para cultivos puros o consorcios involucrados (O'Reilly y Crawford, 1989; Ebadi *et al.*, 2017).

A partir de estos resultados es necesario evaluar para las cepas seleccionadas los porcentajes de remoción de los compuestos en el tiempo, como medida de la eficiencia de los mecanismos de su degradación. Asimismo, resulta imprescindible realizar una evaluación y optimización de las condiciones de degradación de estos compuestos que permitan alcanzar niveles de remoción eficiente; entre los que se incluye el análisis de la influencia del pH, la temperatura, la oxigenación y otros factores influyen en la actividad metabólica de la célula y la velocidad de degradación (Geetha *et al.*, 2013).

Por otra parte la evaluación de cultivos mixtos diseñados a partir de las cepas seleccionadas en el estudio pudiera favorecer los procesos de oxidación; teniendo en cuenta que las poblaciones mixtas de bacterias resultan eficientes para la degradación de sustratos recalcitrantes y en la biorremediación de contaminantes en condiciones naturales (Núñez, 2003; Antoniou *et al.*, 2015; Ebadi *et al.*, 2017).

3.4. Caracterización taxonómica de bacterias heterótrofas

La microbiología marina presenta gran dificultad en la identificación de microorganismos de este ambiente, pues la taxonomía bacteriana se ha desarrollado a partir de microorganismos aislados del medio terrestre y comprende una serie de ensayos y evaluaciones limitados a estos microorganismos. Por esta razón los métodos para ambientes extremadamente variables como el marino no han sido totalmente desarrollados. En general, las pruebas para clasificación empleadas regularmente pueden ser aplicadas a cepas marinas; sin embargo para algunos cultivos modificaciones son requeridas como por ejemplo en la concentración de cloruro de sodio del medio y en la temperatura de incubación (Pérez *et al.*, 2001).

Para la caracterización taxonómica de los aislamientos procedentes de aguas aledañas a los diferentes ecosistemas marinos se seleccionaron las cepas de acuerdo a las capacidades metabólicas relacionadas con la degradación de compuestos de diferente naturaleza, priorizando áreas de interés ecológico como archipiélago Jardines de la Reina y Ciénaga de Zapata.

La identificación fue dirigida a 22 cultivos, entre los que se incluyeron dos aislados de áreas de playas correspondientes a la costa norte de la península de Hicacos (CBM-990) y playa Maraví de la provincia de Guantánamo (CBM-956) y 10 de las áreas de manglar de la Ciénaga de Zapata (CBM-785, CBM-787, CBM-789, CMB-791, CBM-795, CBM-799, CBM-810, CBM-814, CBM-817, CBM-819), teniendo en cuenta, además la importancia de este ecosistema como el humedal mejor conservado de

Cuba. Asimismo, se consideraron 10 aislados procedentes de las aguas adyacentes de arrecifes coralinos del golfo de Cazones (CBM-1029, CBM-1035, CBM-1301) y del archipiélago Jardines de la Reina (CBM-874, CBM-1253, CBM-1255, CBM-1314, CBM-1323, CBM-1349, CBM-1366).

En la Tabla 14 aparece el resultado del análisis de las pruebas bioquímicas y fisiológicas de la caracterización de los cultivos seleccionados a partir de sus potencialidades biotecnológicas.

Tabla 14. Ubicación taxonómica de bacterias heterótrofas aisladas de agua de mar de diferentes ecosistemas marinos de Cuba. (*Informados por primera vez para aguas de las áreas de arrecifes coralinos y playas evaluadas).

Ecosistemas	Cepas	Especies
Manglares	CBM-785	<i>Planococcus columbae</i> Suresh, Mayilraj, Bhattacharya y Chakrabarti 2007, 1269 ^{VP}
	CBM-787	<i>Planococcus citreus</i> Migula 1894, 236. ^{AL}
	CBM-789	<i>Planococcus</i> sp. Migula 1894, 236 ^{AL}
	CBM-791	<i>Bacillus</i> sp. Cohn 1872, 174. ^{AL}
	CBM-795	<i>Planococcus columbae</i> Suresh, Mayilraj, Bhattacharya y Chakrabarti 2007, 1269 ^{VP}
	CBM-799	<i>Bacillus badius</i> Batchelor, 1919, 23. ^{AL}
	CBM-810	<i>Listeria</i> sp. Pirie 1940a, 383 ^{AL}
	CBM-814	<i>Planococcus</i> sp. Migula 1894, 236 ^{AL}
	CBM-817	<i>Brevibacillus brevis</i> Shida, Takagi, Kadowaki y Komagata 1996a, 943 ^{VP}
	CBM-819	<i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner 1915, 29 ^{AL}
Playas	CBM-990	<i>Bacillus carboniphilus</i> Fujita, Shida, Takagi, Kunugita, Pankrushina and Matsuhashi 1996, 118 ^{VP}
	CBM-956	* <i>Listeria</i> sp. Pirie 1940a, 383 ^{AL}
Arrecifes Coralinos	CBM-874	* <i>Ochrobacterium</i> sp. Holmes, Popoff, Kiredjian and Kersters 1988, 412 ^{VP}
	CBM-1253	* <i>Bacillus carboniphilus</i> Fujita, Shida, Takagi, Kunugita, Pankrushina and Matsuhashi 1996, 118 ^{VP}
	CBM-1255	* <i>Bacillus carboniphilus</i> Fujita, Shida, Takagi, Kunugita, Pankrushina and Matsuhashi 1996, 118 ^{VP}
	CBM-1314	<i>Listeria</i> sp. Pirie 1940a, 383 ^{AL}
	CBM-1323	* <i>Ochrobacterium</i> sp. Holmes, Popoff, Kiredjian and Kersters 1988, 412 ^{VP}
	CBM-1349	* <i>Sphingomonas</i> sp. Yabuuchi, Yano, Oyaizu, Hashimoto, Ezaki and Yamamoto 1990b, 321 ^{VP}
	CBM-1366	* <i>Pasteurella</i> sp. Trevisan 1887, 94 ^{AL} Nom. Cons. Opin. 13, Jud. Comm. 1954b, 153
	CBM-1029	* <i>Bacillus carboniphilus</i> Fujita, Shida, Takagi, Kunugita, Pankrushina and Matsuhashi 1996, 118 ^{VP}
	CBM-1035	* <i>Bacillus carboniphilus</i> Fujita, Shida, Takagi, Kunugita, Pankrushina and Matsuhashi 1996, 118 ^{VP}
	CBM-1301	* <i>B. fordii</i> Scheldeman, Rodríguez-Díaz, Goris, Pil, De Clerck, Herman, De Vos, Logan and Heyndrickx 2004, 1363 ^{VP}

Al analizar los resultados de las pruebas de caracterización morfológica, cultural, fisiológica y bioquímica de cada grupo de bacterias se determinó que 10 de los cultivos correspondiente a CBM-791, CBM-799, CBM-817, CBM-819, CBM-990, CBM-1253, CBM-1255, CBM-1029, CBM-1035 y CBM-1301 pertenecen a la familia Bacillaceae y particularmente del género *Bacillus*, donde se incluyen bacterias de forma bacilar Gram positivas formadoras de esporas, fundamentalmente quimiorganotrófica, aerobias o anaerobias facultativas. En particular, estos cultivos están representados

en al menos cinco especies: *B. badius* (1), *B. thuringiensis* (1), *B. carboniphilus* (5) y *B. fordii* (1) (Tabla 14). Asimismo, se determinó que de acuerdo a las características del cultivo CBM-817 podría incluirse en la especie *Bacillus brevis*, reclasificada actualmente como *Brevibacillus brevis* (Vos *et al.*, 2009).

Similares resultados fueron referidos por Lugioyo (2003) y Miravet (2003) en las aguas oceánicas adyacentes a Cuba y en los arrecifes del golfo de Batabanó, al SW Cuba, respectivamente. En estos estudios se encontraron altos porcentajes de bacterias Gram positivas del género *Bacillus*.

Entre los cultivos seleccionados cinco corresponden al grupo de los cocos Gram positivos, aislados de manglar (CBM-785, CBM-787, CBM-789, CBM-795 y CBM-814). Las características culturales y fisiológicas sugieren que pertenecen a la familia Planococcaceae, de acuerdo a la reclasificación de algunos géneros pertenecientes anteriormente a la familia Micrococcaceae. La caracterización de estos cultivos indica su ubicación taxonómica en el género *Planococcus* teniendo en cuenta su forma de agrupación en pares, grupos de tres células y ocasionalmente en tétradas; son mótils, no forman esporas, catalasa positiva, no fermentan la glucosa y otros azúcares y son característicos de fuentes marinas (Sneath *et al.*, 1986). El aislado CBM-787 manifiesta características que distingue a la especie *Planococcus citreus* por presentar particularidades tales como la oxidasa negativa, no hemolíticos, urea e indol negativo, crecimiento solo hasta el 15% de NaCl, no hidrolizar la esculina, almidón o Tween 80, y producen colonias amarillas. Esta especie es característica de fuentes marinas y también puede estar asociada a organismos marinos (moluscos y crustáceos) (Sneath *et al.*, 1986).

En el caso de las cepas CBM-785 y CBM-795 fueron agrupadas como *Planococcus columbae*, por reducir nitrato, crecimiento solo hasta el 10% de NaCl, no hidrolizan la esculina, almidón o Tween 80, así como urea e indol negativo.

En particular la ubicación taxonómica del grupo de las bacterias Gram negativas se realizó mediante el uso el sistema de galerías API 20NE, el cual brinda la posibilidad de evaluar la diferentes actividades enzimáticas de los cultivos de forma rápida y estandarizada. Los aislados (CBM-810, CBM-956, CBM-874, CBM-1314, CBM-1323, CBM-1349, CBM-1366) se ubicaron en los géneros *Listeria*, *Ochrobacterium*, *Sphingomonas* y *Pasteurella* (Tabla 14).

Debe destacarse que los géneros *Ochrobacterium*, *Sphingomonas* y *Pasteurella* y las especies *Bacillus carboniphilus* y *Bacillus fordii* fueron informados por primera vez para aguas aledañas a los arrecifes coralinos evaluados.

En general, la existencia de estos géneros ha sido informada en aguas y sedimentos de la plataforma cubana (Miravet *et al.*, 1992) y en aguas oceánicas adyacentes (Lugioyo, 2003). En particular, en aguas del archipiélago Jardines de la Reina se demostró el predominio de la familia *Bacillaceae*,

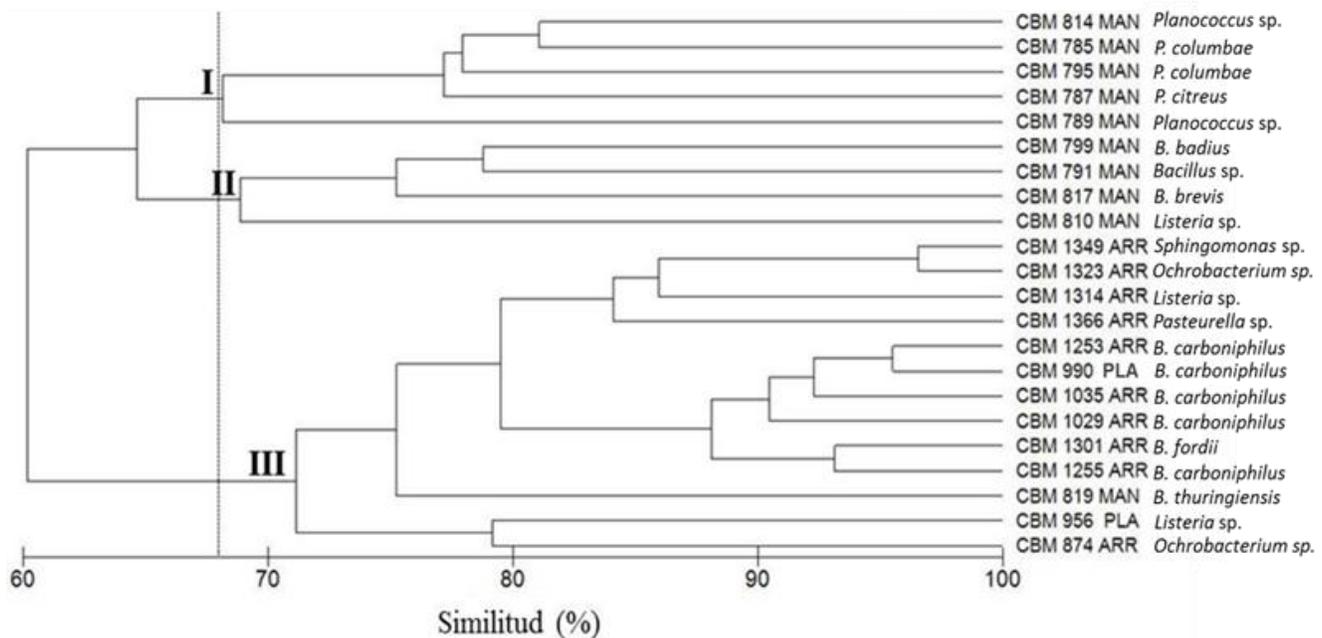
específicamente al género *Bacillus* y la familia *Micrococcaceae*, dentro de los que se incluyeron los géneros *Planococcus*, *Staphylococcus* y *Micrococcus* (Coya, 1999).

Asimismo, es necesario establecer una estrategia de identificación para todos los cultivos ubicados hasta nivel de género que incluyan pruebas complementarias para la diferenciación entre especies.

En la literatura especializada aparece descrito las amplias potencialidades que presentan las bacterias del género *Bacillus*, y en particular aquellos aislados de fuentes marinas son potentes productores de sustancias biológicamente activas (Fenical, 1996). Las especies de este género son productores de sustancias antimicrobianas, tensioactivos y degradadores de los hidrocarburos del petróleo (Sardessai y Bhosle, 2002; Ortiz *et al.*, 2014). También existen evidencias de la degradación de hidrocarburos del petróleo y la producción de tensioactivos en géneros como *Planococcus* (Lin; 1996), mientras del género *Listeria* se ha informado su capacidad para degradar compuestos oleosos (Lira, 2014).

En el análisis de similitud, realizado con los resultados de las evaluaciones fisiológicas y las bioactividades, a las cepas seleccionadas se obtuvo el dendograma en el que se aprecia que de modo general todos los aislados presentan un 65% de similitud (Figura 20). Se detectaron un total de tres grupos de homología a un nivel de similitud del 68, 69 y 71% (grupos I, II y III respectivamente). Resulta de interés que en los grupos I y II solo se presentan aislados de aguas de las áreas de manglar. No se observó una relación directa de los nodos de la Figura 20 con respecto a géneros o especies, ya que la misma especie se incluyó en diferentes grupos, lo cual está determinado por la diversidad de potencialidades o capacidades metabólicas que pueden presentar cultivos filogenéticamente relacionados. Aunque debe destacarse que en el grupo III se incluyeron los aislados con mayor actividad bioquímica total por cepa (ATC).

En la Figura 21 se muestra el porcentaje de actividad bioquímica total por cepa, de los aislados con mayores capacidades metabólicas.



MAN: Manglar, ARR: Arrecifes, PLA: Playa

Figura 20. Dendrograma de similitud confeccionado a partir de las características fisiológicas y potencialidades biotecnológicas de las cepas seleccionadas (Índice de similitud de Brays-Curtis).

En los cultivos seleccionados procedentes de las estaciones de manglar la actividad total por cepa varió entre 27 y 36%, mientras en los aislados de aguas aledañas a los arrecifes coralinos el rango de actividad se manifestó entre 45 y 66% (Figura 21). En general, entre las pruebas que más contribuyeron a estos porcentajes se incluyen la excreción de enzimas hidrolíticas como amilasa, gelatinasa y lipasa, la producción de compuestos con actividad superficial y formación de ácido de diferentes azúcares. No obstante, debe destacarse, que la distribución de cepas que presentan la capacidad de utilizar como fuente de carbono y energía diferentes carbohidratos, compuestos fenólicos e hidrocarburos del petróleo, crecimiento en presencia de NaCl, motilidad y actividad caseinasa fue similar en los aislamientos independientemente de los ecosistemas evaluado.

En los aislados se observó una mayor proporción de cepas capaces de utilizar monosacáridos (90,9%) y la lactosa (68,2%), como fuente de carbono, con respecto a la sacarosa (45,5%) y el almidón (59,1%). La actividad proteolítica (50,0%) predominó sobre la amilolítica (31,8%) y la lipolítica (27,3%). Asimismo, debe destacarse que la cepa CBM-1314 procedente de Jardines de la Reina presentó las tres actividades.

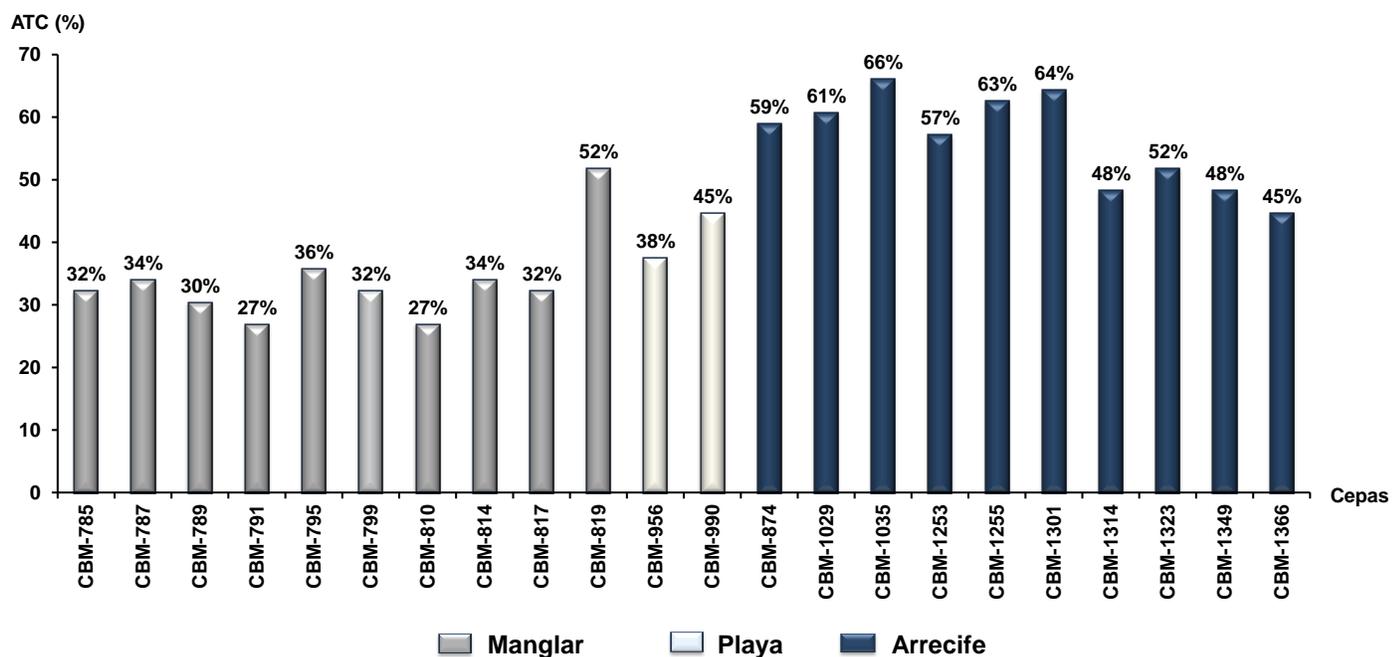


Figura 21. Actividad bioquímica total por cepa (ATC) expresada como el porcentaje de pruebas bioquímicas y bioactividades positivas con respecto al total de pruebas seleccionadas.

Es importante destacar que, aunque las cepas procedentes de estaciones de manglar mostraron una menor heterogeneidad fenotípica que las aisladas en las áreas de arrecifes, todas las cepas manifestaron una amplia variedad de potencialidades fisiológicas. Esto evidencia el amplio espectro de degradación de compuestos diferentes de las bacterias heterótrofas aisladas de agua de mar de diferentes ecosistemas.

La caracterización de estos cultivos microbianos contribuye a ampliar el conocimiento de la diversidad bacteriana marina de Cuba, que aún es incipiente. Además, tributa a una mejor comprensión de su diversidad funcional en términos de productividad, resiliencia y resistencia, que permite estimar las capacidades de autodepuración en los ecosistemas a partir de la actividad microbiana.

Además, el amplio espectro de degradación de compuestos diferentes de las bacterias heterótrofas aisladas permite ampliar las potencialidades de uso de estos microorganismos ya que constituyen la base de futuras investigaciones de aplicación en el campo de la biotecnología y medio ambiente.

3.5. Actualización de la base de datos de la colección

La Colección de Bacterias Marinas actualmente cuenta con 1070 cultivos aislados de diferentes ecosistemas marinos, que representa una importante fuente de productos de interés biotecnológicos; teniendo en cuenta que el 98% de los cultivos en colección presentan al menos una bioactividad de las evaluadas como tamizaje primario.

A partir de la ejecución de este proyecto; así como de otros proyectos y servicios ejecutados durante la etapa que se evalúa se incorporaron a la colección 507 cultivos procedentes de agua y sedimentos de diferentes ecosistemas marinos de Cuba. En particular, se incluyeron cultivos de bacterias procedentes de aguas de arrecifes mesofóticos, correspondientes a más de 30 m de profundidad, cultivos de actinomicetos marinos dirigidos a la búsqueda de sustancias de interés farmacológico, entre otros.

Actualmente, el nivel de identificación de la colección no resulta satisfactorio, teniendo en cuenta que 47,2% de estos cultivos permanecen aún sin caracterizar para su posible identificación taxonómica. No obstante, las investigaciones realizadas por los diferentes proyectos en ejecución permitieron la ubicación taxonómica del 38,3% de los cultivos incorporados a la colección en esta etapa, de ellos el 84,0% hasta nivel de género y un 16,0% hasta el nivel de especie. Entre los géneros identificados se incluyen *Bacillus*, *Planococcus*, *Vibrio*, *Listeria*, *Photobacterium*, entre otros.

Durante la etapa se actualizó toda la información referente a los cultivos de nueva incorporación; de manera que se logró el registro actualizado de las 1070 cepas de bacterias heterótrofas de origen marino pertenecientes a la Colección de Bacterias Marinas del ICIMAR y permite disponer de la información organizada y detallada sobre la diversidad bacteriana asociada a diferentes ecosistemas marinos de Cuba.

La base de datos de la Colección de Bacterias Marinas del ICIMAR brinda un medio factible para las posibles consultas por los diferentes campos que la conforman.

En las Figuras 22, 23 y 24 aparecen los resultados de diferentes búsquedas en la base de datos de la Colección de Bacterias Marinas, que muestran las posibilidades consultas por los diferentes campos de ésta, proporcionando a su vez la posibilidad de emitir reportes de su contenido, de forma clara y amena.

Figura 22. Ventana para una búsqueda a partir de criterios específicos previamente seleccionados (criterios: pertenecientes a la Colección de Bacterias Marinas, aisladas del golfo de Cazones, cepas viables y bacilos Gram + y esporulados).

Principal Colecciones Administradores Historial Personal Enlace		
Total de resultados encontrados: 20		
No. de la cepa	Designación taxonómica	Persona que aisló
CBM 1280	Bacillus sp.	Valia
CBM 1283	Bacillus sp.	Valia
CBM 1289	Bacillus sp.	Valia
CBM 1295	Bacillus sp.	Valia
CBM 1300	Bacillus sp.	Valia
CBM 1301	B. fordii	Valia
CBM 1303	Bacillus sp.	Valia

Figura 23. Resultado de la búsqueda a partir de criterios específicos previamente seleccionados (criterios: pertenecientes a la Colección de Bacterias Marinas, aisladas del golfo de Cazones, cepas viables y bacilos Gram + y esporulados).

Información de la cepa seleccionada			
← Características Generales Carac. Culturales Actividad Enzimática Asim. Fuentes de Carbono Actividad Antimicrobiana Actividad →			
No de Cepa	Colección	No Viejo	
CBM 1301	Bacterias marinas	42	
Area Geográfica	Fecha	Aislada por	
Golfo de Cazones (Este de la ensenada de cazones)	24/05/2017	Valia	
Fuente Aislamiento	Características Morfológicas	Gram	Estado de la cepa
Agua	Bacilos Esporulados	+	Viva
Características celulares	Medio de cultivo	Designación Taxonómica	
BE+,cortos y sueltos, formando empalizada	Zobell	B. fordii	

Figura 24. Resultados de la búsqueda de la información específica de la cepa CBM 1301 (vista de la pestaña de características generales).

4. CONCLUSIONES

- ✓ Se logró un incremento en el conocimiento de la diversidad microbiana marina a partir de la caracterización de 392 cultivos de bacterias heterótrofas aisladas de agua de mar de diferentes ecosistemas marinos y costeros, con predominio del grupo de las bacterias Gram positivas. En general los cultivos de bacterias aisladas presentaron gran diversidad de potencialidades.
- ✓ Se incorporaron 92 cultivos procedentes de aguas aledañas a los arrecifes del archipiélago Jardines de la Reina, 87 de playas y manglares de la península de Guanahacabibes y 47 de playas de la provincia de Guantánamo, zonas que no estaban representadas en la Colección de Bacterias Marinas de ICIMAR.
- ✓ El 53,3% del total los cultivos caracterizados mostraron entre cuatro y siete de las actividades evaluadas. Las actividades biológicas de estos cultivos demostraron que el 93,1% asimiló al menos uno de los carbohidratos evaluados, el 69,6% producen enzimas hidrolíticas, el 65,8% presentan interacción con nitrógeno, el 5,1% solubilizan fosfato, el 5,9% mostró actividad antimicrobiana, el 4,8% actividad hemolítica, el 37,5% producen compuestos tensioactivos y el 38,2% fueron capaces de degradar el petróleo y compuestos fenólicos, que demuestra las elevadas potencialidades de las bacterias heterótrofas marinas.
- ✓ Los cultivos CBM-990, CBM-1034, CBM-1036 y CBM-1301 presentaron valores de velocidad específica de crecimiento y productividad frente a hidrocarburos y compuestos fenólicos como única fuente de carbono y energía, que evidencian la degradación por vía asimilativa de estos compuestos. Mediante espectroscopía infrarroja se demostró una disminución cualitativa de las bandas correspondientes a hidrocarburos del petróleo en CBM-990 y CBM-1301.
- ✓ La caracterización taxonómica de los aislados seleccionados demostró que el género *Bacillus* presentó mayor actividad biológica. En particular, los géneros *Ochrobacterium*, *Pasteurella* y *Sphingomonas*, y las especies *Bacillus carboniphilus* y *Bacillus fordii* se informan por primera vez para aguas aledañas a las áreas de arrecifes coralinos en estudio.

5. RECOMENDACIONES

- ✓ Continuar los estudios de identificación mediante taxonomía polifásica de los cultivos aislados, así como la evaluación de otras potencialidades.
- ✓ Continuar los estudios de degradación de xenobióticos para las cepas seleccionadas, donde se incluya la influencia de diferentes factores en el metabolismo celular como pH, temperatura, oxigenación, entre otros.
- ✓ Evaluar y cuantificar los remanentes de la degradación mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa para establecer los mecanismos de degradación y su inocuidad para el ambiente.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña-González, J. A., Dalsgaard, T. y Thamdrup, B. (2006). El golfo Dulce de Costa Rica, un sumidero de nitrógeno oceánico. *Investigación y Ciencia*, 34-35.
- Águila, R. N. (2012). Caracterización y bioactividad de bacterias asociadas a la esponja *Aplysina gerardogreeni* del Golfo de California. Tesis de Doctorado en Ciencias Marinas. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, Bolivia. 86 pp.
- Albadry, M., Waters, A., Tomioka, T. y Hamann, M. T. (2014). Karlotoxin 5 synthetic studies: Concise synthesis of a C91–17 polyol chain fragment. *Planta Medica*, 80(10), PK1.
- Alcolado, P., Claro-Madruga, R., Martínez-Daranas, B., Menéndez-Macías, G., García-Parrado, P., Perigó, E., Cantelar, K., Miravet, M. E., Lugioyo, G. M., del Valle, R., Melo, N., Montalvo, J. F. y Enríquez, D. (1999). Evaluación diagnóstica preliminar de los arrecifes coralinos del oeste de Cayo Largo del Sur: 1998-1999. Informe final. Archivo Científico. Instituto de Oceanología. 51 pp.
- Ahmad, D., Sylvestre, M. y Sondossi, M. (1991). Subcloning of bph genes from *Pseudomonas testosteroni* B-356 in *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*: evidence for deshalogenation during initial attack and chlorobiphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2880-2887.
- Ambujom, S. y Manilal, V. B. (1995). Phenol degradation by a stable aerobic consortium and its bacterial isolates. *Biotech Letters*. 17(4), 443-448.
- Feby, A. y Nair, S. (2010). Sponge-associated bacteria of Lakshadweep coral reefs, India: resource for extracellular hydrolytic enzymes. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 1(04), 330.
- Antoniou, E., Fodelianakis, S., Korkakaki, E. y Kalogerakis, N. (2015). Biosurfactant production from marine hydrocarbon-degrading consortia and pure bacterial strains using crude oil as carbon source. *Frontiers in microbiology*, 6, 274.
- Appeldoorn, R. S. y Lindeman, K. C. (2003). A Caribbean-wide survey of marine reserves: spatial coverage and attributes of effectiveness. *Gulf. Caribb. Res.*, 14(2), 139-154.
- Ardila, N. y Rondo, L. (2006). Fijación de Nitrógeno atmosférico. Agricultura sensitiva. Consultado en: www.agriculturasensitiva.com/n_atmosferico.htm.
- Arnosti, C., Jørgensen, B. B., Sagemann, J. y Thamdrup, B. (1998). Temperature dependence of microbial degradation of organic matter in marine sediments: polysaccharide hydrolysis, oxygen consumption, and sulfate reduction. *Marine Ecology Progress Series*, 165, 59-70.
- Arnosti, C. (2011). Microbial extracellular enzymes and the marine carbon cycle. *Annual review of marine science*, 3, 401-425.
- Astel, A. M., Bigus, K. y Stec, M. (2018). Microbial enzymatic activity and its relation to organic matter abundance on sheltered and exposed beaches on the Polish coast. *Oceanologia*, 60(3), 312-330.
- Atlas, R. M. (2010). Handbook of microbiological media. Fourth Edition. AMS Pres and CRC Pres. 2044 pp.
- Ayyakkannu K. y Chandramohan D. (1971) Occurrence and distribution of phosphate solubilizing bacteria and phosphatase in marine sediments at Porto Novo. *Marine Biology*, 11, 201-205.
- Baboshin, M. A. y Golovleva, L. A. (2012). Aerobic bacterial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and its kinetic aspects. *Microbiology*, 81(6), 639-650.
- Baggs, E., M. y Phillipppot, L. (2011). Nitrous oxide production in the terrestrial environment Nitrogen Cycling in Bacteria: Molecular Analysis. J. W. B. Moir ed. Caister Academic Press. Norfolk. U.K. 211-232pp.
- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., ... y Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(2), 427-444.

- Banat, I. M., Satpute, S. K., Cameotra, S. S., Patil, R. y Nyayanit, N. V. (2014). Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in microbiology*, 5, 697.
- Becerra Gutiérrez, L. K., y Horna Acevedo, M. V. (2016). Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de canales y suelos contaminados con hidrocarburos. *Scientia Agropecuaria*, 7(1), 23-31.
- Benson J. (2001). Microbiological Applications Lab Manual, Eighth Edition, VIII. Identification of Unknown Bacteria 49. Physiological Characteristics: Hydrolytic Reactions, 51. Use of Bergey's Manual and *Identibacter interactus*. The McGraw-Hill Companies, 170-172pp.
- Bensoussan, C., Rival, N., Hanquet, G., Colobert, F., Reymond, S. y Cossy, J. (2014). Isolation, structural determination and synthetic approaches toward amphidinol 3. *Nat. Prod. Rep*, 31, 468-488.
- Bermúdez J., Alejandro González A., Castro Y., Ortiz E., Núñez R., Oramas J. y García Y. (2014). Estudio de la contaminación con hidrocarburos de un ecosistema de manglar en Cayo Santa María, Jardines del Rey, Cuba. *Revista Investigaciones Marinas*, 34(1), 36-48
- Bharathi, D., Rajalakshmi, G., Komathi, S., Mythili, S., Queen, J. y Sithara N. V. (2016). Isolation, characterization and production of lipase producing bacterial strains from petrol spilled soil. *International Journal of Current Research*, 8(08), 36723-36726.
- 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.
- Borah, D., y Yadav, R. N. S. (2017). Bioremediation of petroleum based contaminants with biosurfactant produced by a newly isolated petroleum oil degrading bacterial strain. *Egyptian Journal of Petroleum*, 26(1), 181-188.
- Borem, A., F.R. Santos y D.E. Bowen. (2003). Understanding Biotechnology Chapter 12 Biodiversity, Prentice Hall PTR, 240 pp.
- Bowman, J. P. (2007). Bioactive compounds synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Mar Drugs*, 5(4), 220-241.
- Boyer, E. W., Howarth, R. W., Galloway, J.N., Dentener, F. J., Green, P. A. y Vörösmarty, C.J. (2006). Riverine nitrogen export from continents to the coasts. *Global Biogeochemical Cycles*, 20(1).
- Broecker W. y Peng T. (1982) Tracers in the Sea, Lamont-Doherty geological observatory. Palisades, New York 690pp.
- Brozel, V. y Cloete. (1991). Resistance of bacteria from cooling waters to bactericides. *J. Industrial. Microbiol. & Biotech*, 8, 273-276.
- Cabranes, Y. (2005). Cinética de degradación de hidrocarburos del petróleo por *Bacillus alcalophilus* cepa CBM-225. Tesis de Maestría, Fac. Biología, U.H.
- Cabranes, Y.; Núñez, R.; Martínez, J.; Ortiz, E. (2006). Bacterias del género *Bacillus* degradadoras de n-hexano aisladas de sedimentos marinos: parámetros cinéticos. *Rev. Invest. Mar*, 27(3), 183-189.
- Carmenate, M., Lugioyo, M., Echevarria, Y., García, I., Almeida, M., Roque, L., Alamo, B., Sanchez, M., Fernández, J. y González, D. (2016). Monitoreo de la calidad de las aguas en la costa norte y sur de la península de Hicacos utilizando indicadores de la respuesta rápida. Informe Final. Instituto de Oceanología, 48pp.
- Claro R. (2007). La Biodiversidad marina de Cuba. (CD-ROM) Instituto de Oceanología, Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, La Habana, Cuba, 53pp.
- Cobián, D., Perera, S., Pérez, A., Aguilar, S., Álvarez, A., Hernández, Z., Espinosa, L., Salvat, H., Alcalá, A., Ezquivel, M. y Hernández, L. (2013). Caracterización de los ecosistemas costeros al norte del Área Protegida de Recursos Manejados Península de Guanahacabibes, Cuba. *Rev. Mar. Cost*, 5, 37-55p.
- Colwell, R. R. y R. Grigorova (1987). Methods in Microbiology, Vol.19, Current Methods for Classifications and Identification of Microorganisms, Ed. Acad. Press. 518pp.

- Correa, D. (2016). Biodiversidad y ecología funcional de bacterias desnitrificantes. Tesis de doctorado. 78pp.
- Cowan, S. T. y Steel, K. J. (1965). Manual for the identification of medical bacteria. Third Edition. Edited by G. I. Barrow and R. K. A. Feltham. 331pp.
- Coya, L. (1999). Bacterioplancton del Archipiélago "Los Jardines de la Reina" al sur de Cuba, en la época de verano: distribución, taxonomía y actividad antimicrobiana. Trabajo de Diploma en opción al Título de Licenciado en Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. 43pp.
- Cunha, A. y Almeida, A. (2009). Inorganic nutrient regulation of bacterioplankton heterotrophic activity in an estuarine system (Ria de Aveiro, Portugal). *Hydrobiologia*, 628, 81-93.
- Choi, H., Mascuch, S.J. Villa, F.A. Byrum, T. Teasdale, M.E. Smith, J.E. Preskitt, L.B. Rowley, D.C. Gerwick, L. y Gerwick W.H. (2012). Honaucins A–C, Potent Inhibitors of Inflammation and Bacterial Quorum Sensing: Synthetic Derivatives and Structure-Activity Relationships. *Chem Biol*, 19, 589-598.
- Das, S., Lyla, P. S. y Khan, S. A. (2006): Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Curr. Sci*, 90(10), 1325-1335.
- Delgado F. y Ferro J. (2006). Nuevas variantes estructurales en la vegetación de los manglares de la Reserva de la Biosfera Península de Guanahacabibes. Ecosistema de manglar en el Archipiélago Cubano. Estudios y experiencias enfocados a su gestión. Editorial Academia La Habana, 68pp.
- Dias, A., Dini-Androte, F., Dini-Androte, F., Lacava, P., Sá, A., Melo, I., Azevedo, J. y Arujo W. (2009). Diversity and biotechnological potencial of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. *World J. Microbiol Biotechnol*, 25,1305-1311.
- Donadio, S., Monciardini, P. y Sosio, M. (2007). Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. *Nat. Prod. Rep.*, 24, 1073-1109.
- Ducklow, H. (2000). Bacterial Production and biomass in the Ocean. En: *Microbial Ecology of the Oceans*. D. Kirchman (ed.), New York, 85-120p.
- Ebadi, A., Khoshkholgh N. A., Olamaee, M., Hashemi, M. y Ghorbani R. (2017). Effective bioremediation of a petroleum-polluted saline soil by a surfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *Journal of Advanced Research*, 8, 627–633.
- Enríquez, D., Y. Delgado, M. Carmenate, T. Reyes, R. Nuñez, D. María, E. Perigó, O. C. Alburquerque, I. García, Y. Echeverría et al. (2013). Evaluación de la calidad ambiental de la zona marino costera de la Reserva de Biosfera Ciénaga de Zapata, a partir de indicadores microbiológicos y químicos. Informe final de proyecto. Instituto de Oceanología, AMA, CITMA. La Habana, Cuba. 65 pp.
- Fábregas, J., Muñoz, A., Otero, A., Barja, J. L. y Romaris, M. (1991). A Preliminary Study on Antimicrobial Activities of Some Bacteria Isolated from Marine Environment. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(7), 1377-1382.
- Faulkner, D. J. (2002). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 19, 1-48.
- Fenical W. (1996). Marine biodiversity and the medicine cabinet: The status of new drugs from marine organisms. *Oceanography*, 9(1), 23-27.
- Fenical, W. y Jensen, P.R. (1996). Marine Microorganisms: A New Biomedical Resource. En: *Marine Biotechnology*, D.H. Attaway y O.R. Zaborsky (eds.). Plenum Press, New York. 419-455 pp.
- Frazão, B., Vasconcelos, V. y Antunes, A. (2012). Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: an overview. *Marine drugs*, 10(8), 1812-1851.
- Fuentes, S., Méndez, V., Aguila, P. y Seeger, M. (2014). Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93,1421-1430.
- Garay, Y. C. (2003). Determinación cuali-cuantitativa de bacterias heterótrofas relacionadas con el ciclo del nitrógeno, calidad bacteriológica de agua y sedimentos recolectados en fiordos y canales

- de la XI región de Chile. Tesis de Grado. Fac. de Ciencias, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- Geetha, S.J., Joshi, S. y Kathrotiya, S. (2013). Isolation and characterization of hydrocarbon degrading bacterial isolate from oil contaminated sites. *APCBEE Procedia*, 5, 237–241.
- 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. 47-84p.
- Glöckner, F. O., Stal, L. J., Sandaa, R.-A., Gasol, J. M., O’Gara, F., Hernandez, F., Labrenz, M., Stoica, E., Varela, M. M., Bordalo, A. y Pitta, P. (2012). Marine Microbial Diversity and its role in Ecosystem Functioning and Environmental Change. Marine Board Position Paper 17. Calewaert, J.B. y McDonough N. (Eds.). Marine Board-ESF, Ostend, Belgium.
- González, G. y Aguilar, C. (2004). Los ecosistemas marinos de la región noroccidental de Cuba. En: Diagnóstico ambiental del Golfo de México Volumen I. Caso Chávez, M., Pisanty, I., y Ezcurra, E (compiladores) 603-625p.
- González-Ferrer, S. (Ed.) (2004). Corales pétreos, jardines sumergidos de Cuba. Editorial Academia, Impresora da Vinci, La Habana. 322 pp.
- Gupta, N.; Das, S. y Basak, U. C. (2007). Useful extracellular activity of bacteria isolated from Bhitarkanika mangrove ecosystem of Orissa coast. *Malaysian Journal of Microbiology*, 3(2), 15-18.
- Harley, J. P. (2002). Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edition IV. Biochemical Activities of Bacteria 27. Proteins, Amino Acids, and Enzymes, IV. Biochemical Activities in Bacteria 22 Carbohydrates III: Starch Hydrolysis © The McGraw-Hill Companies, 139-142p.
- Harrigan, W. F., Mac Cance, M. E., Acha, I. G. y Villanueva, J. R. (1968). Métodos de Laboratorio en Microbiología. Ed. Academia, León, España. 63- 81pp.
- Hau, H. H. y Galnick, J. A. (2007). Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Ann. Rev. Microbiol*, 61, 237-258.
- Hayatsu, M., Tago, K., y Saito, M. (2008). Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Sci plant Nutr*, 54, 33-45.
- Head, I.M., Jones, D. M. y Röling, W. F. M. (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat. Rev. Microbiol*, 4, 173-182.
- Heffer, P. y Prud’homme, M. (2015). Fertilizer outlook 2015-2019. International Fertilizer Industry Association (IFA), ed. 83rd. IFA Annual conference, Istanbul, Turkey.
- Herbert, R. A. (1999). Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS microbiology reviews*, 23(5), 563-590.
- Hernández-Fernández, L., Guimaraes, M. B., Arias, R. B. y Clero, L. A. (2011). Composición de las comunidades de octocorales y corales pétreos y la incidencia del blanqueamiento del 2005 en Jardines de la Reina, Cuba. *Rev. Mar. Cost.*, 3, 77-90.
- Hernández-Zulueta, J., Leal. S., Lugioyo, M., Loza, S., Curbelo, R. y Ortiz, E. (2011). Microbiota bacteriana asociada a los cultivos de dos especies de diatomeas bentónicas. *Revista Investigaciones Marinas*, 34(1), 104-120.
- Holguin, G., Vazquez, P., Jimena Sánchez, J., López de Los Santos, Y., Ana L. Flores-Mireles, A.L., Melgarejo, L. M., Vanegas, J., Galindo, T., Dávila-Lule, A., Polanía, J. y Ruiz M. (2011). Microbiología del manglar. Capítulo 5. En Los Manglares de la Península de Baja California. D.R. Publicación de divulgación del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- Hoppe, H., Schramm, W. y Bacalod, P. (1988). Spatial and temporal distribution of pelagic microorganisms and their proteolytic activity over a partly destroyed coral reef. *Mar. Ecol. Prog. Ser*, 44, 95-102.

- Hulth, S., Aller, R. C., Canfield, D. E., Dalsgaard, T., Engström, P., Gilbert, F., ... y Thamdrup, B. (2005). Nitrogen removal in marine environments: recent findings and future research challenges. *Marine Chemistry*, 94(1-4), 125-145.
- Iglesias, E., Morales, M., González, R. A., Alfonso, M. J., Weng, Z., López, G. y Cabrera, R. I. (2005). Lineamientos para el establecimiento y funcionamiento de las colecciones cubanas de microorganismos y otros materiales biológicos. Ediciones Finlay.
- Jackson, W. A. y Pardue, J. H. (1999). Potential for intrinsic and enhanced crude oil biodegradation in Louisiana's freshwater marshes. *Wetlands*, 19(1), 28-34.
- Jacobucci, D., Vasconcelos, C., Matsuura, A., Falcon, F. y Durrant, L. (2001). Degradation of diesel oil by biosurfactant-producing bacterial strains. <http://www.dotincsolution.com>
- Jiménez, D.; Medina, S. y Gracida, J. (2010). Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. *Rev. Int. Contam. Ambient*, 26(1), 65-84.
- Joseph, N. I. (1996). Microorganismos marinos degradadores de hidrocarburos y sus aplicaciones en la industria petrolera. Tesis de Maestría. UH. Cuba
- Kannapiran, E., y Ramkumar, V. S. (2011). Isolation of phosphate solubilizing bacteria from the sediments of Thondi coast, Palk Strait, Southeast coast of India. *Annals of Biological Research*, 2(5), 157-163.
- Karlapudi, A. P., Venkateswarulu, T. C., Tammineedi, J., Kanumuri, L., Ravuru, B. K., ramu Dirisala, V. y Kodali, V. P. (2018). Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. *Petroleum*, 4(3), 241-249.
- Karn, S. K., Chakrabarty, S. K. y Reddy, M. S. (2010). Characterization of pentachlorophenol degrading *Bacillus* strains from secondary pulp-and-paper-industry sludge. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(7), 609-613.
- Kazutoshiand, S. y Misawa, N. (2014). New and Rare Carotenoids Isolated from Marine Bacteria and Their Antioxidant Activities. *Marine Drugs*, 12, 1690-1698.
- Khan, A. A., Peiris, P., Sharma, N., Maddini, G., Raghvan, V. y Courteau, C. (2011). Effect on alpha-amylase production by employing polyethylene glycol at different concentrations in medium. *American Journal of Food Technology*, 6(4), 289-297.
- Khopade, A., Biao, R., Liu, X., Mahadik, K., Zhang, L., y Kokare, C. (2012). Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiosis* sp. B4. *Desalination*, 285, 198-204.
- Kobayashi, J. (2008). Amphidinolides and its related macrolides from marine dinoflagellates. *J. Antibiot*, 61, 271-284.
- Kolbe-Boelke, J., Anders, E. M. y Nehr, K. (1988). Microbial communities in the saturated groundwater environment. *Microb. Ecol*, 16, 31-48.
- Kreig, N. R. y Holt, J. G. (1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Williams and Willkins (eds.), Baltimore, London, 964pp.
- Lakshmipriya, V. P. y Sivakumar, P. K. (2012). Isolation and characterization of total heterotrophic bacteria and exopolysaccharide produced from mangrove ecosystem. *IJPBA*, 3(3), 679-684.
- Daouadji, K. L., Benattouche, Z. y Abbouni, B. (2014). Screening selection identification production and optimization of bacterial lipase isolated from industrial rejection of gas station. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(6), 455-559.
- Lauro, F. M., McDougald, D., Thomas, T., Williams, T. J., Egan, S., Rice, S., ... y Ferriera, S. (2009). The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(37), 15527-15533.
- Lee, C. W., Ng, A. Y., Narayanan, K., Sim, E. U., y Ng, C. C. (2009). Isolation and characterization of culturable bacteria from tropical coastal waters. *Ciencias Marinas*, 35(2), 153-167.
- Lee, L. P., Karbul, H. M., Citartan, M., Gopinath, S. C., Lakshmipriya, T. y Tang, T. H. (2015). Lipase-secreting *Bacillus* species in an oil-contaminated habitat: promising strains to alleviate oil pollution. *BioMed research international*, 2015.

- León, J., L. Liza, I. Soto, M. Torres y A. Orosco (2010). Bacterias marinas productoras de compuestos antibacterianos aisladas a partir de invertebrados intermareales. *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Publica*, 27(2), 215-221.
- Lerch, G. (1977). *La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas*. Ed. Científico Técnica. La Habana.
- Lin, S. C. (1996). Biosurfactants: recent advances. *J Chem. Technol. Biotechnol*, 66,109-120.
- Linton, D. R., Smith, R., Alcolado, P. M., Hanson, C., Edwards, P., Estrada, R., Fisher, T., Fernández, R. G., Geraldés, F., McCoy, C., Vaughan, D., Voegeli, V., Warner, G. y Wiener, J. (2002). Status of Coral Reefs in the Northern Caribbean and Atlantic Node of the GCRMN. En C. R. Wilkinson (Ed.), *Status of Coral reefs of the World: 2002*. GCRMN Report, Australian. Townsville, Australia: Institute of Marine Science. 277-302pp.
- Lira, K. (2014). Caracterización bioquímica y molecular de bacterias hidrocarburoclíticas precedentes del estero aledaño al ejido Emiliano Zapata, Tuxpan. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana. Tuxpan, Veracruz. 91pp.
- López, J. y Gódia, F. (1998). *Ingeniería Bioquímica*. 1^{ra} Edición. Ed. SINTESIS, S.A.
- Loza, S., Busutil, L., Rodríguez, S., Lugioyo, G.M., García, I., Rey-Villier, N.,... y Hernandez-Zanuy, A. (2017). Evaluación de la vulnerabilidad de la biodiversidad marino-costera al cambio climático en los arrecifes coralinos del golfo de Cazones y del archipiélago Jardines de la Reina. Informe Final de Proyecto. Archivo Científico ICIMAR, La Habana, Cuba. 176pp.
- Lugioyo, G. 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, Universidad de La Habana, Cuba, 140pp.
- Lugioyo, G. M., Miravet, M. E., Pérez, R., Álvarez, C. y Espinosa, G. (2007). Evaluación del estado trófico de las aguas oceánicas adyacentes al sur de Cuba a partir de indicadores microbiológicos y fitoplanctónicos. *Rev. Invest. Mar*, 28(3), 201-207.
- Lugioyo G. M. y Alfonso A. I. (2016). Distribución del bacterioplancton y estado trófico de las aguas oceánicas de los golfos de Cazones y sur de Ana María y Guacanayabo. 69-75pp. En: Rey-Villiers, N. (ed.) *Línea base ambiental para el estudio del cambio climático en el golfo de Cazones y el archipiélago Jardines de la Reina, Cuba*. Instituto de Oceanología, CITMA. La Habana, Cuba. 182 pp.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Stahl, D. (2010). *Brock Biology of Microorganisms*. Ed., Benjamin Cummings, 13th edition, 1152pp.
- Madigan, M., J. M. Martinko, D. A. Stahl y D. P. Clark (2012). *Broock Biology of microorganisms*. 13th. Pearson Education, Inc. San Francisco, Unated Estates of America. 1043pp.
- Madigan, M., J. Martinko y J. Parker. (2005). *Brock, Biology of microorganisms*. Prentice Hall, New York. 1088pp.
- 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. 121-132 pp.
- Martínez, M., Montalvo, J. F., Miravet, M. E., Lugioyo, M., Loza, S. y Pérez, R. (2004). Evaluación de las zonas de impacto antrópico del golfo de Batabanó. Informe Final. Archivo Instituto Oceanología. 57 pp.
- Masepohl, B. y Klipp, W. (1996). Organization and regulation of genes encoding the molybdenum nitrogenase and the alternative nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*. *Archives of microbiology*, 165(2), 80-90.
- Menéndez, L., Guzmán, J. M., y Priego, Á. (2006). Manglares del Archipiélago Cubano: aspectos generales. *Ecosistema de Manglar en el Archipiélago Cubano, La Habana, Cuba*, 17-27.
- Mirabal, L., Ortega, E., Rodés, R., Fernández, L. y Pérez, E. (2000): Another nitrogen-fixing microorganism in sugarcane stalks: *Bacillus brevis*. *Cultivos Tropicales*, 21(4), 9-12.

- Miravet, M. E. (2003). Abundancia, actividad y diversidad de las bacterias heterótrofas en el Golfo de Batabanó y su uso como indicadores ambientales. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas, La Habana, Cuba. 59pp.
- Miravet, M. E., Lugioyo, M. y Pérez, G. (1992). Bacterias marinas heterótrofas. Distribución y actividad descomponedora en la macrolaguna interior del Archipiélago Sabana-Camagüey (julio 1989 y febrero 1991). Informe Cient. -Téc. Proyecto GEF- PNUD. 12pp.
- Miravet, M. E.; Lugioyo, M. y Bellota, M. (1993). Distribución espacio-temporal de bacterias heterótrofas en las aguas oceánicas al sur de Cuba. *Avicennia*, 0, 1-12.
- Miravet, M. E., Martínez-Daranas, B. y Penie, I. (1994). Indicadores microbiológicos del estado de salud de los arrecifes que bordean el Archipiélago Sabana-Camagüey. Informe Cient. Téc. Proyecto GEF- PNUD. 9 pp.
- Miravet, M. E., Loza, S., Lugioyo, G. M., Enríquez, D. y Montalvo, J. (2000). Evaluación de la calidad ambiental de un ecosistema arrecifal aledaño a Cayo Largo del Sur. Informe Final, Archivo Científico del IDO.
- Miravet, M., Enriquez, D., Lugioyo, M. y Delgado, Y. (2003). Primeros reportes de hongos y bacterias heterótrofas aislados de los arrecifes de la plataforma SW de Cuba. *Serie Oceanológica*, 1, 1-16.
- Miravet, M.E., Lugioyo, M., Loza, S., Enriquez, D., Delgado, Y., Carmenate, M. y Pérez, D. (2009). Procedimientos para el Monitoreo de la Calidad Ambiental en la Zona Marino Costera a partir de Microorganismos. Ediciones Centenario Santo Domingo, República Dominicana. 95pp.
- Montalvo-Estévez, J. F., García-Ramil, I. D. L. A., Almeida-Rodríguez, M., Betanzos-Vega, A. y García-García, N. (2014). Modelación de la eutroficación e índice de calidad del agua en algunas bahías del archipiélago Sabana Camagüey. *Tecnología Química*, 34(3).
- Morgante, V., López-López, A., Flores, C., González, M., González, B., Vásquez, M., Rosselló-Mora, R. y Seeger, M. (2010). Bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. Strain MHP41 promotes simazine attenuation and bacterial community changes in agricultural soils. *FEMS Microbiol. Ecol*, 71, 114-126.
- Moriarty, D. J. y Hayward, A. C. (1982). Ultrastructure of bacteria and the proportion of Gram-negative bacteria in marine sediments. *Microb. Ecol*, 8, 1-14.
- Mudryk, Z. J. y Podgórska, B. (2006). Enzymatic Activity of Bacterial Strains Isolated from Marine Beach Sediments. *Polish J of Environ Stud*, 15, 441-448.
- Mujahid, T. Y., Siddiqui, K., Ahmed, R., Kazmi, S. U. y Ahmed, N. (2014). Isolation and partial characterization of phosphate solubilizing bacteria isolated from soil and marine samples. *Pak J Pharm Sci*, 27, 1483-1490.
- Mulligan, C.; Cooper, D. y Neufeld, R. (1984). Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. *J Fermentation Technol*, 62(4), 311-314.
- Muscholl-Silberhorn, A., Thiel, V. y Imhoff, J. (2008). Abundance and bioactivity of cultured sponge-associated bacteria from the Mediterranean Sea. *Microb. Ecol.*, 55, 94-106.
- Nair, A. V., Vijayan, K. K., Chakraborty, K. y Antony, M. L. (2012). Diversity and characterization of antagonistic bacteria from tropical estuarine habitats of Cochin, India for fish health management. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(7), 2581-2592.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett*, 170, 265-270.
- Nazarenko, E. L., Crawford, R. J. y Ivanova, E. P. (2011). The structural diversity of carbohydrate antigens of selected gram-negative marine bacteria. *Marine Drugs*, 9(10), 1914-1954.
- Nguyen, T. T. y Sabatini, D. A. (2011). Characterization and emulsification properties of rhamnolipid and sophorolipid biosurfactants and their applications. *Int. J.Mol.Sci.*, 12, 1232-1244.
- 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.

- Ong, K. S., Chin, H. S. y Teo, K. C. (2011). Screening of antibiotic sensitivity, antibacterial and enzymatic activities of microbes isolated from ex-tin mining lake. *African Journal of Microbiology Research*, 5(17), 2460-2466.
- Oppenheimer, C. H. y ZoBell, C. E. (1952). The growth and viability of sixty three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *Jour. Mar. Res.*, 11, 10-18.
- O'reilly, K. T. y Crawford, R. L. (1989). Degradation of pentachlorophenol by polyurethane-immobilized *Flavobacterium* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(9), 2113-2118.
- Ortiz, E. (2004). Obtención y caracterización de un biotensioactivo a partir de *Bacillus licheniformis* IDO-60. Tesis de Doctorado, Fac. Biología, U.H.
- Ortiz, E., Valdés, O., Fernández, M., Hernández, Y., González, K., Núñez, R. (2014). Productos y servicios de la diversidad biológica marina. En *V Informe Nacional al Convenio sobre la Diversidad Biológica. República de Cuba*: 223-239. <https://www.cbd.int/countries/?country=cu>.
- Pamer, E., Vujovic, G., Knezevic, P., Kojic, D., Prvulovic, D., Mijanovic, B. y Gruber-Lajsic, G. (2011). Water quality in lakes of Vojevodina. *International Journal of Environmental. Research*, 5, 891-900.
- Pasto, D. J. y Johnson, C. R. (1980) Determinaciones de estructuras orgánicas. La Habana. 39pp.
- Paul, D. y Sinha, S. N. (2013). Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of some bacterial strains isolated from thermal power plant effluent exposed water of river Ganga. *CIBTech Journal of Microbiology*, 2(3), 1-7.
- Pérez, G., Lugioyo, G. M. y Cárdenas, D. (2001). Identificación de bacterias aisladas de aguas oceánicas cubanas y sus capacidades antimicrobianas. *Rev. Elect. Instituto de Oceanología*, 0.
- Perliński, P. y Mudryk, Z. J. (2016). Activity of extracellular enzymes on the marine beach differing in the level of antropopressure. *Environmental monitoring and assessment*, 188(3), 188.
- Planes, R. L. (1988). *Diseño estadístico de experimentos*. Científico-Técnica.
- Plaza, G., Zjawiony, I. y Banat, I. (2006). Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant producing bacteria from hydrocarbon contaminated bioremediated soils. *J Petro Science Eng*, 50(1), 71-77.
- Potts, M. (1984): Nitrogen fixation in mangrove forests. In: *Hydrobiology of the mangal*. FD, I Dor, The Hague: Dr. W. Junk Publishers.
- Priest, F. G. (1989). Isolation and Identification of aerobic endospore-forming bacteria. *Biotechnology Handbooks*, Vol. II. Bacillus. Harwood, C. R. (ed). Plenum Press, NY. 27-56p.
- Priest, F.G. (1993). Systematics and Ecology of Bacillus. En: *Bacillus subtilis* and other Gram Positive Bacteria. Biochemistry, Phisiology and Molecular Genetics. Sonenshein, A. Cap. I. 3-16p.
- Raghul, S. S. y Bhat, S. G. (2011). Seasonal variation in the hydrolytic exoenzyme profile of *Vibrio* sp. associated with the marine benthic environment of South India. *Indian Journal of Geo-Marine Science*, 40, 826-833.
- Raghul, S. S., Bhat, S. G., Chandrasekaran, M., Francis, V. y Thachil, E. T. (2014). Biodegradation of polyvinyl alcohol-low linear density polyethylene-blended plastic film by consortium of marine benthic vibrios. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(7), 1827-1834.
- Sekhon Randhawa, K. K. y Rahman, P. K. (2014). Rhamnolipid biosurfactants-past, present, and future scenario of global market. *Frontiers in microbiology*, 5, 454.
- Richardson, J., Stead, D., Elphinistone, J. y Coutts, R. (2002). Diversity *Burkholderia* isolate form woodland rhizosphere enviroments. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 616-630.
- Rigo, E. (2004). Aplicação de lipases como auxiliary no pré-tratamento de efluentes de frigoríficos de suínos e bovinos. Dissertação (Maestría), URI, Erechim. RS.
- Ruiz, I. (2017). Las áreas protegidas de Cuba. Centro Nacional de Áreas Protegidas, 2017. ISBN: 978-959-287-079-6.

- Saavedra, J. M., F. Acevedo, M. González y M. Seeger (2010). Mineralization of PCBs by the genetically modified strain *Cupriavidus necator* JMS34 and its application for bioremediation of PCBs in soil. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87, 1543-1554.
- Salgado-Bernal, I., Durán-Domínguez, C., Cruz-Arias, M., Carballo-Valdés, M. E. y Martínez-Sardiñas, A. (2012). Bacterias rizosféricas con potencialidades fisiológicas para eliminar materia orgánica de aguas residuales. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 28(1), 17-26.
- Sánchez, J. y Sanabria, J. (2009). Metabolismos microbianos involucrados en procesos avanzados para la remoción de Nitrógeno, una revisión prospectiva. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 114-124.
- Sánchez, T., Arauco, K., Woolcott, J. C., León, J. y Galarreta, H. (2004). Optimización de parámetros cinéticos de bacterias proteolíticas aisladas de ambientes marinos contaminados. *Rev. Per. Quím. Ing. Quím*, 7(1), 56-62.
- Santos, O. C., Pontes, P. V., Santos, J. F., Muricy, G., Giambiagi-deMarval, M. y Laport, M. S. (2010). Isolation, characterization and phylogeny of sponge-associated bacteria with antimicrobial activities from Brazil. *Research in Microbiology*, 161(7), 604-612.
- Sardesai, Y. N. y Bhosle, S. (2002). Organic solvent-tolerant bacteria in mangrove ecosystem. *Current Science*, 82(6), 25p.
- Satheesh, S., Soniamby, A. R., Sunjaiy Shankar, C. V. y Punitha, S. M. (2012). Antifouling activities of marine bacteria associated with sponge (*Sigmadocia* sp.). *J. Ocean. Univ. China*, 11(3), 354-360.
- Seeger, M. y D. H. Pieper. (2010). Genetics of biphenyl biodegradation and co-metabolism of PBCs. En: Timmis, K. N. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Seshadri, S. y Ignacimuthu, S. (2002). Variations in heterotrophic and phosphate solubilizing bacteria from Chennai southeast coast of India.
- Shon, H. K. y Vigneswaran, S. (2006). Effluent Organic Matter (EfOM) in wastewater: constituents, effects, and treatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 36, 327-374.
- Sivasankar, P., Sugesh, S., Vijayan, P., Sivakumar, K., Vijayalakshmi, S., Balasubramanian, T. y Mayavu, P. (2013). Efficient production of L-asparaginase by marine *Streptomyces* sp. isolated from Bay of Bengal, India. *African Journal of Microbiology Research*, 7, 4015-4021.
- Sneath, H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. y Holt, J. G. (1986). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2, 999-1418.
- Sparacino-Watkins, C. E., Tejero, J., Sun, B., Gauthier, M. C., Thomas, J., Ragireddy, V., Merchant B. A., Wang, J., Azarov, I., Basu, P. y Gladwin, M. T. (2014). Nitrite reductase and nitric-oxide synthase activity of the mitochondrial molybdopterin enzymes mARC1 and mARC2. *J. Biol. Chem.*, 289, 10345-10358.
- Stein L. (2011). Heterotrophic nitrification and nitrifier denitrification. En: *Nitrification*. Ward B, Arp D, Klotz M (ed). ASM Press, Washington, DC. 95-114p.
- Smriga, S., Sandin, S. A. y Azam, F. (2010). Abundance, diversity, and activity of microbial assemblages associated with coral reef fish guts and feces. *FEMS Microbiology Ecology*, 73(1), 31-42.
- Suárez M. (2004). Reducción del contenido de compuestos fenólicos en aguas residuales por microorganismos. Tesis de doctorado. Universidad de La Habana. Cuba
- Sutton, M. A., Howard, C., Erisman, J. W., Billen, G., Bleeker, A., Grenfelt, P., ... y Grizzetti, B. (2011). The European Nitrogen Assessment (Eds.) Cambridge University Press.
- Thavasi, R., Subramanyam Namburu, V. R. M., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T. y Banat, I. M. (2009). Biosurfactant production by *Azotobacter chroococcum* isolated from the marine environment. *Mar. Biotechnol.*, 11, 551-556.

- Travers, D. (2007). Microbiología aplicada a las ciencias ambientales: reactores biológicos para el tratamiento de efluentes industriales. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. Facultad de Ciencias y Facultad de Química. Universidad de La República. Uruguay.
- Usama, R. A. (2010). Antimicrobial activities from plant cell cultures and marine sponge-associated actinomycetes. Tesis de Doctorado. Universidad Julius-Maximilian Würzburg, Alemania. 172 pp.
- 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.
- Victoria del Rio, I. y Penie, I. (1998). Hidrología, pp.117-125 In M. Vales, A. Alvarez, L. Montes y A. Ávila, eds., Estudio Nacional sobre la Diversidad Biológica en la República de Cuba. UMA/CENBIO/ IES/ AMA /CITMA, La Habana.
- Villaverde, M., Ortiz, E., Pérez, G., Núñez, R. y Almazán, V. (1997). Informe Científico de proyecto de investigación. Estimulación de pozos de petróleo de Jatibonico. Archivo Científico. Instituto de Oceanología. CITMA Ciudad de la Habana, Cuba.
- Vinothini, C., Sudhakar, S. y Ravikumar, R. (2015). Biodegradation of petroleum and crude oil by *Pseudomonas putida* and *Bacillus cereus*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 4(1), 318-329.
- Vos, P. D., G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer y W. B. Whitman (2009): Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Volume Three: The Firmicutes. New York: Springer Science & Business Media.
- Ward, B. B., Arp, D. J. y Klotz, M. G. (2011). Nitrification. American Society for Microbiology Press. Washington.
- Wilson, P. W. y Knight, S. C. (1952). Experiments in bacterial physiology. Burgess, Minneapolis, USA, 49 pp.
- Yeon, S.H.; Jeong, W.J. y Park, J.S. (2005). The diversity of culturable organotrophic bacteria from local solar salterns. *J. Microbiol*, 43(1), 1-10p.
- Zamora, A., Malaver, N. y Ramos, J. (2012): Análisis funcional de microorganismos: un estimador de diversidad y estructura comunitaria. *Acta Biol. Venez*, 32(1), 57-86.
- Zhang, Y., Dong, J., Yang, Z., Zhang, S. y Wang, Y. (2008): Phylogenetic diversity of nitrogen-fixing bacteria in mangrove sediments assessed by PCR denaturing gradient gel electrophoresis. *Arch. Microbiol*, 190,19-28.
- Zobell, C. E. y Upham H. C. (1944). A list of marine bacteria including descriptions of Sixto new species. *Bull. Scripps Inst. Oceanogr*, 5: 239-92.