

PROSPECCIÓN DE BACTERIAS MARINAS CON PROPIEDAD BIOSURFACTANTE AISLADAS DEL GOLFO DE NICOYA, COSTA RICA

Fernando Campos Calderón*
Natalia Solís-Miranda**
Francisco García Fernández***

Recibido: 17-12-13 Aceptado: 31-07-2014

RESUMEN

El océano es una fuente rica de microorganismos cuyos metabolitos secundarios generan diversos compuestos como los biosurfactantes. En Costa Rica, se ha determinado que se han desarrollado pocos estudios y son muy pocas las aplicaciones que se han generado con estos tipos de compuestos, por lo tanto este estudio trata de realizar actividades prospectivas con cepas bacterianas extraídas del Golfo de Nicoya y así seleccionar aquellas que son productoras de biosurfactantes. Tres cepas bacterianas extraídas de su medio natural, fueron identificadas y luego cultivadas en agar marino. Seguidamente se purificaron y se obtuvo biosurfactante añadiendo o no aceite de maíz, asimismo se evaluó su actividad biosurfactante por medio de la técnica de detección con queroseno. Se determinó el índice de emulsión (E_{24}) y la actividad hemolítica de las tres cepas. Por otro lado las cepas en donde se identificaron las bacterias de *Pseudomonas aeruginosa*, fueron las que tuvieron actividad biosurfactante, contrario a la cepa identificada con la bacteria *Aeromonas hyla*; sin embargo ésta última sí presentó actividad hemolítica, contrario a las cepas de *P. aeruginosa*. Probablemente *A. hyla* no alcanzó una etapa de máxima actividad y no llegó a completar su etapa de adaptación y aclimatación.

PALABRAS CLAVE: *Pseudomonas aeruginosa*; *Aeromonas hyla*; Biosurfactante; Microorganismos

ABSTRACT

The ocean is a resource rich in microorganisms that can produce a great variety of compounds such as biosurfactants. In Costa Rica, it has been determined that the development of studies and applications of these compounds are scarce. For instance, this study pretends to make prospective activities with bacterial strains extracted from the Nicoya Gulf, and select the ones that can produce biosurfactants. Three strains were extracted from their natural environment, were identified and were grown in marine agar. Then, they were purified and the resultant biosurfactant was obtained using whether or not corn oil. Also the biosurfactant activity was evaluated with the kerosene detection technique. The index emulsion (E_{24}) and hemolytic activity of the three strains were determined. Two of the strains were identified as *Pseudomonas aeruginosa*; they also presented biosurfactant activity but no hemolytic activity. The other strain was identified as *Aeromonas hyla*, and presented hemolytic activity opposing the two other strains. This type of response might be because *A. hyla* probably did not accomplish its maximum stage of activity and it did not complete its stage of adaptation and acclimatization.

KEY WORDS: *Pseudomonas aeruginosa*; *Aeromonas hyla*; Microorganisms; Biosurfactants

* Servicio Regional de Oceanografía y Laboratorio de Oceanografía y Manejo Costero, Departamento de Física, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica, fercc_13@hotmail.com

** Estación de Biología Marina "Juan Bertolgia Richards", Universidad Nacional, Puntarenas, Costa Rica, natalia.solmi@gmail.com

*** Instituto Regional de Sustancias Toxicas, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica; vibichis27@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que el océano es una fuente rica de compuestos extremadamente potentes para diversos usos (Gochfeld *et al.*, 2003; Haefner, 2003; Newman & Cragg, 2005). Es un ambiente donde se desarrollan sin número de organismos con capacidad de metabolizar sustancias de utilidad, como los compuestos de superficie activa (Banat *et al.*, 2010). Estos tensoactivos conocidos como biosurfactantes son de bajo peso molecular con propiedades anfipáticas, las cuales les permiten la movilización a través de interfaces de diferentes polaridades (Piróllo *et al.*, 2008; Banat *et al.*, 2010). Los biosurfactantes son compuestos que cuentan con la capacidad de remoción y biodegradación de contaminantes (Liu *et al.*, 1991) lo cual ha generado una atención por sus propiedades en la bioremediación. Las moléculas que conforman los biosurfactantes pueden ser monosacáridos, polisacáridos, oligosacáridos, aminoácidos, péptidos, ácidos grasos saturados o insaturados con grupos fosfatos o carboxilos (De Jonghe *et al.*, 2005).

Diversos sectores de la industria han emprendido con interés el proceso de extracción de surfactantes de origen biológico (Jiménez *et al.*, 2010). Existe una gran versatilidad en cuanto a la aplicación de éstos, como lo puede ser en la agricultura, farmacia, industria alimentaria, elaboración de cosméticos, bioprocesos de remediación (Singh *et al.*, 2007; Nitschke *et al.*, 2011) e incluso como posible método de mitigación de floraciones algales nocivas (Ahn *et al.*, 2003; Baek *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Gustaffson *et al.*, 2009; Riviera *et al.*, 2010). Para estos casos se ha observado que los efectos en el ecosistema son menores, al igual que su toxicidad por lo que su proceso de biodegradación es más fácil (Mulligan, 2005). La principal desventaja de estos es su obtención y purificación

ya que es más costosa que por los de vía sintética (Deleu & Paquot, 2004).

Entre las bacterias más estudiadas para la extracción de biosurfactantes se encuentran el género *Pseudomonas* (Piróllo *et al.*, 2008; Abdel-Mawgoud *et al.*, 2009) y el género *Bacillus* (Sotirova *et al.*, 2008). Sin embargo, también es posible extraerlo de otros organismos como hongos y levaduras (Kim *et al.*, 1999; Satpute *et al.*, 2010). Sin embargo, para Costa Rica los estudios de microorganismos en el Golfo de Nicoya han estado centrados principalmente en la búsqueda de patógenos en fuentes proteicas de interés comercial como moluscos (Rodríguez & Antillón, 1998; García & Antillón, 2006) y a eventos de floraciones algales nocivas (Hargraves & Viquez, 1981; Vargas & Freer, 2002; Vargas *et al.*, 2008), sin embargo la prospección de metabolitos secundarios producidos por organismos marinos no se ha desarrollado completamente.

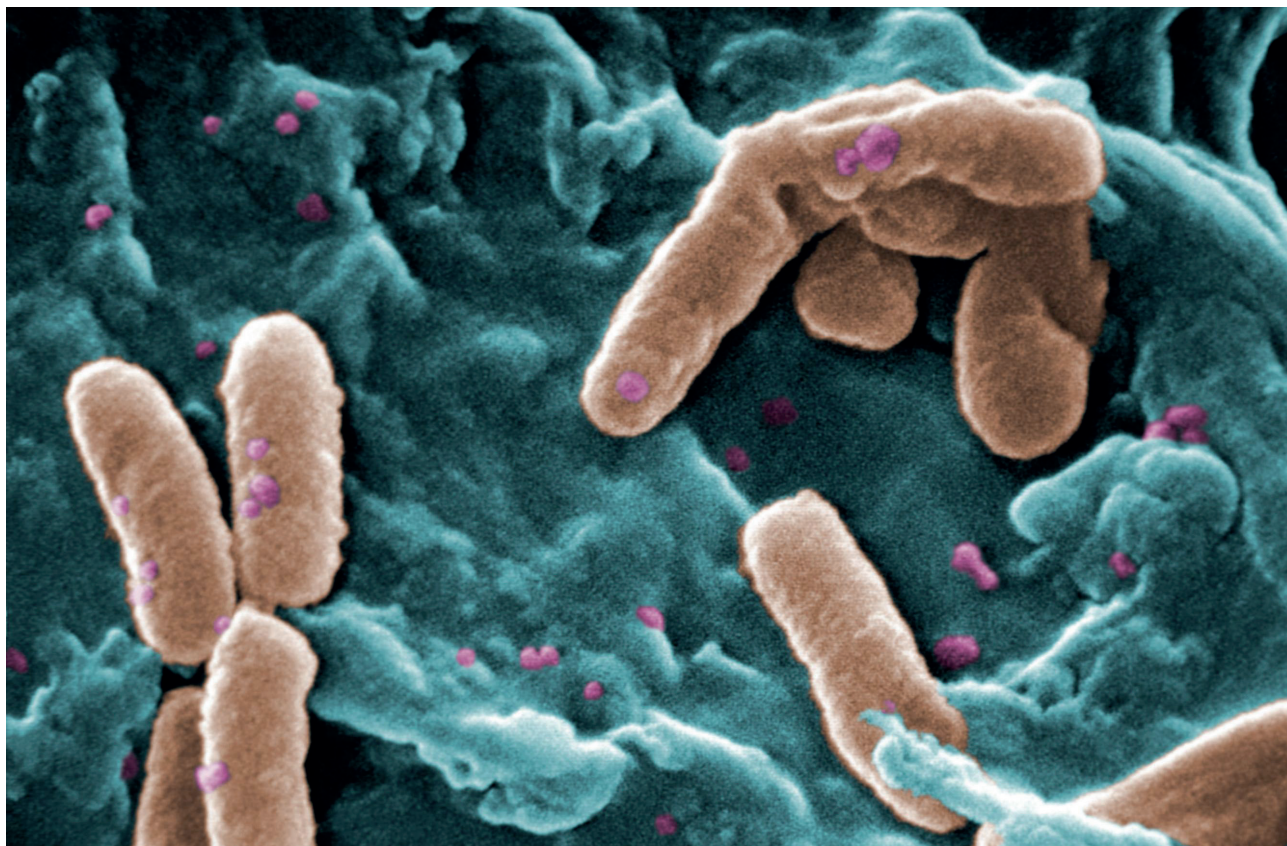
Hasta la fecha, la biodiversidad de los microbios marinos y la versatilidad de sus metabolitos con propiedades bioactivas no se han explorado a fondo. En este trabajo se utilizaron diferentes cepas bacterianas marinas aisladas en el Golfo de Nicoya con el fin de realizar actividades prospectivas y así seleccionar bacterias marinas con capacidad de producir biosurfactantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas utilizadas: Se utilizaron tres cepas de bacterias marinas de aislamientos ambientales (ver condiciones de aislamiento en el Cuadro 1) de diferentes puntos del Golfo de Nicoya. El criterio de selección para las cepas fue por crecimiento en agar marino, la forma de la colonia y color. Posteriormente, para su identificación se emplearon baterías de pruebas estandarizadas API® 20 NE Biomérieux para todas las cepas.

Cuadro 1. Caracterización y actividad (Queroseno y Hemolítica) con las cepas bacterianas marinas aisladas del Golfo de Nicoya, Costa Rica.

Cepa	Género y especie	Lugar de colecta	Temperatura (°C)	Salinidad (PSU)	Actividad	
					Queroseno	Hemolisis
87	<i>P. aeruginosa</i>	Tárcoles	28.6	33	+	-
139	<i>A. hyla</i>	Tempisque	28.9	5	-	+
206	<i>P. aeruginosa</i>	Tempisque	29.6	10	+	-



Pseudomonas aeruginosa al microscopio de barrido, con falso color.
Foto: Janice Haney Carr. <http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Pseudomonas.jpg>

Cultivos bacterianos: Cada cepa se cultivó en agar marino por 48 horas a la temperatura del medio en el cual fue aislada (Cuadro 1). Posteriormente, se transfirió a 200 ml de medio de producción (MP) descrito por Torres y Sánchez (2001).

Purificación y obtención del biosurfactante: Las extracciones se efectuaron por medio de dos tratamientos diferentes con fin de examinar si existe una mayor eficacia de éstos. En el primero, se realizó una inducción para la producción de ramnolípidos al adicionar en el medio de cultivo, aceite de maíz 10% y se dejó en agitación por 48 h. Luego se centrifugaron a 5000 x g durante 10 minutos y se extrajo el sobrenadante para su análisis según lo describen Torres & Sánchez (2001). El segundo tratamiento, fue sin la adición del aceite. Consistió en centrifugar una alícuota del medio de producción (1 ml) a 11000 g por 20 minutos a 4 °C. El biosurfactante fue precipitado mediante la adición de etanol frío puro (Gnanamania *et. al.*, 2010).

Evaluación de la producción: La actividad biosurfactante fue evaluada utilizando la técnica de detección con queroseno y se determinó el índice de emulsión (E_{24}) para ambos tratamientos según lo describen Cooper & Goldenberg (1987). La actividad hemolítica puede evidenciar actividad de lisis a causa del biosurfactante. Por esto se llevó a cabo una prueba para determinar la actividad hemolítica, descrita por Carrillo *et al.* (1996). Las placas de agar sangre se inocularon con las cepas (1 ml de inóculo) y se mantuvieron a 30 °C durante 48 h. Se efectuaron dos réplicas por cepa para cada metodología. Finalmente se midió el diámetro de degradación como indicador de la actividad hemolítica.

RESULTADOS

Dos de las tres cepas bacterianas utilizadas durante la investigación se identificaron como *Pseudomonas aeruginosa*; la restante se identificó como *Aeromonas hyla*. En cuanto a la obtención

y purificación del biosurfactante, todas las cepas produjeron biosurfactante. Sin embargo, a la hora de evaluar dicha producción con la técnica de detección con queroseno, se determinó que solamente las cepas de *P. aeruginosa* mostraron actividad emulsificadora; una cuyo índice (E_{24}) fue 0,40 y la otra de 0,02. Por otro lado, a pesar de que *A. hyla* no mostró este tipo de actividad emulsificadora, es decir su índice E_{24} fue de 0, fue la única que sí mostró actividad hemolítica, cuyo diámetro fue de 1,5 mm.

Diversas investigaciones han reportado que la cantidad, calidad y tipo de biosurfactantes producido por los microorganismos, dependen en gran parte del medio de cultivo y de condiciones ambientales, como también de la especie del microorganismo que los produce (Alexander, 1994). En el presente estudio, en cuanto a la obtención y purificación del biosurfactante, todas las cepas analizadas produjeron biosurfactante. Sin embargo, según Luna *et al.*, (2005) para obtener una mayor producción de biosurfactantes es importante adicionar una fuente orgánica de nitrógeno, ya que la concentración de dicha fuente tiene relación directa con la producción del biosurfactante, lo cual puede deberse al aporte de cofactores enzimáticos y de nitrógeno orgánico simple por este nutriente.

Por otra parte, según Guerra *et al.* (1984), la adición de un sustrato insoluble como el hexadecano, tiene también un efecto positivo en la producción de biosurfactantes, debido a que la función biológica que cumple dicho sustrato se relaciona con la captación de sustratos hidrofóbicos, como son los hidrocarburos. Sin embargo, estos sustratos raramente se utilizan como fuente de carbono y energía con excepción de *Arthrobacter sp.*, *Bacillus subtilis*, *Torulopsis bombicola* y *Pseudomonas aeruginosa*, por lo cual es necesaria la adición de una fuente de carbono convencional como es la fructosa.

Según Riviera *et al.*, (2010), los biosurfactantes son moléculas extracelulares producidas por microorganismos pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, principalmente. Sin embargo, en esta investigación se identificaron dos cepas diferentes *Pseudomonas aeruginosa* y *Aeromonas hyla* como posibles productores de biosurfactantes. La especie *P. aeruginosa* mostró actividad emulsificadora, pero la especie *A. hyla* no mostró este tipo de actividad, pero sí actividad hemolítica. El hecho de que *A. hyla* no haya mostrado una actividad emulsificadora se debió probablemente a que la cepa de esta bacteria no pudo lograr una etapa

de máxima actividad o a que no había llegado a completar su etapa de adaptación y aclimatación (Araujo *et al.*, 2008).

Por otra parte, Van Hamme *et al.* (2006), señalan que el biosurfactante en realidad puede tener una actividad antimicrobiana y es probable que los microorganismos produzcan moléculas tales como agentes antagonistas para ganar ventaja competitiva por el sustrato en las comunidades microbianas, es decir; amensalismo (Tran *et al.*, 2008).

Es así como el interés por los surfactantes microbianos ha estado en aumento en los últimos años debido a sus diversas características deseables; entre éstas se encuentran una efectiva selectividad, son respetuosos para la naturaleza, su estabilidad a elevadas temperaturas, valores de pH y concentración de sales. Hay que añadir que los biosurfactantes son más versátiles en comparación a muchos surfactantes sintéticos (Aycachi, 2008). El interés en la producción de biosurfactantes va en aumento, sin embargo, estos compuestos no compiten económicamente con los surfactantes sintéticos, además la producción a gran escala de biosurfactantes es compleja y difícil, sin dejar de mencionar que algunos biosurfactantes pueden ser tan tóxicos como los sintéticos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Carolina Marín, por ayudarnos activamente el desarrollo de esta contribución y por sus revisiones. También a Ricardo Jiménez del Laboratorio de Acuicultura Marina de la Universidad Nacional por el préstamo de las instalaciones y los aportes al trabajo, como también a Javier Alvarado del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional por el préstamo de instalaciones y revisión del escrito y Catalina Coghi por su ayuda durante la elaboración del ensayo.

REFERENCIAS

- Abdel-Mawgoud, A. M., Mabrouk, M. & Abdel-Haleem, N. (2009). Characterization of Rhamnolipid Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Isolate Bs20. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157: 329-345.
- Ahn, C. Y., Joung, S. H., Jeon, J. W., Kim H. S., Yoon, B. D. & Oh, H. M. (2003). Selective control of cyanobacteria by surfacting-containing culture broth of *Bacillus subtilis* C1. *Biotechnology Letters*, 25: 1137-1142.

- Alexander, M. (1994). Biodegradation and Bioremediation. San Diego, CA, EE.UU: Academic Press.
- Araujo I., Gómez, A., Barrera, M., Angulo, N., Morillo, G., Cárdenas, C. y Herrera, L. (2008). Surfactantes biológicos en la biorremediación de aguas contaminadas con crudo liviano. *Interciencia*, 33(4): 245-250.
- Aycachi, I. R. (2008). *Biodegradación de Petróleo Diésel*. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Baek, S. H., Sun, X., Leen, Y. J., Wang, S. W., Han, K. N., Choi, J. K., Noh, J. H. & Kim, E. K. (2003). Mitigation of harmful algal blooms by sphorolipids. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(5): 651-659.
- Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., Smyth, T. J. & Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87: 427-444.
- Carrillo, P. G., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S. I. & Giulietti, A. M. (1996). Isolation and selection of biosurfactant producing bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12: 82-84.
- Cooper, D. G. & Goldenberg, B. G. (1987). Surface-Active Agents from Two Bacillus Species. *Microbiology*, 53(2): 224-229.
- De Jonghe, K., De Dobbelaere, I., Sarrazyn, R. & Höfte, M. (2005). Control of *Phytophthora cryptogea* in the Hydroponic Forcing of Witloof Chicory with the Rhamnolipid-based Biosurfactant Formulation PRO1. *Plant Pathology*, 54: 219-226.
- Deleu, M. & Paquot, M. (2004). From Renewable Vegetables Resources to Microorganisms: New Trends in Surfactants. *C. R. Chimie*, 7: 641-646.
- García, V. y Antillón, F. (2006). Aislamiento de vibrios enteropatógenos de bivalvos y cieno del Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 38(2): 437-440.
- Gnanamania, A., Kavithaa V., Radhakrishnana N., Rajakumara G. S., Sekaranb G. & Mandala, A. B. (2010). Microbial products (biosurfactant and extracellular chromate reductase) of marine microorganism are the potential agents reduce the oxidative stress induced by toxic heavy metals. *Colloids and Surfaces: Biointerfaces*, 79: 334-339.
- Gochfeld, D. J., El Sayed, K. A., Yousaf, M., Hu, J. F., Bartyzel, P., Dunbar, D. C., Wilkins, S. P., Zjawiony, J. K., Schinazi, R. F., Schlueter-Wirtz, S., Tharnish, P. M. & Hamann, M. T. (2003). Marine natural products as lead anti-HIV agents. *Mini Reviews in Medical Chemistry*, 3(5): 401-424.
- Guerra S. L., Kappeli, O. & Armin-Fiechter, A. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(2):301-305.
- Gustaffson, S., Hultberg, M., Figueroa R. & Rengefors, K. (2009). On the control of HAB species using low biosurfactant concentrations. *Harmful Algae*, 8: 857-863.
- Haefner, B. (2003). Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today*, 8: 536-544.
- Hargraves, P. & Viquez, R. (1981). The Dinoflagellate red tide in Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 29(1): 31-38.
- Jiménez, D., Medina, A., Noel, J. y Gracida, J. (2010). Propiedades, Aplicaciones y Producción de Biotensoactivos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 26(1): 65-84.
- Kim, H. S., Yoon, B. D., Choung, D. H., Oh, H. M., Katsuragi, T. & Tani, Y. (1999). Characterization of a biosurfactant, mannosylerythritol lipid produced from *Candida sp.* SY16. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(5): 713-721.
- Liu Z., Laha, S. & Luthy, R. G. (1991). Surfactant solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in soil-water suspensions. *Water Science and Technology*, 23: 475-485.
- Luna V., Esparza, G. F., Salazar, M. J. y Rodríguez, V. R. (2005). Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de un biosurfactante y remoción de fenantreno por *Penicillium sp.* VI Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería, La Habana, Cuba (pp. 1-4).
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133(2): 183-198.
- Newman, D. J. & Cragg, G. M. (2005). The discovery of anticancer drugs from natural sources. In L., Zhang & A. L. Demain (Eds), *Natural Products: Drug Discovery and Therapeutics Medicines*. New York, USA: Humana Press Inc.
- Nitschke, M., Costa, S. & Contiero, J. (2011). Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest. *Process Biochemistry*, 4(63): 621-630.
- Piróllo, M. P. S.; Mariano, P.; Lovaglio, R., Costa, V., Walter, V., Hausmann, R. & Contiero, J. (2008.). Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site. *Journal of Applied Microbiology*, 105(5): 1484-90.
- Riviera, H., Martínez, E., Osorio, J. y Martínez, E. (2010). Respuesta de biosurfactantes producidos por *Pseudomonas fluorescens* para el control de la gota de la papa *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary, bajo condiciones controladas. *Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(1): 21-30.

- Rodríguez, E. & Antillón, F. (1998). *Aeromonas spp.* y *Plesimonas shigelloides* en bivalvos, ceno y aguas del Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 37(1): 69-73.
- Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M. & Chopade, B. (2010). Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(2): 127-44.
- Singh, A., Van Hamme, D. & Ward, P. (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, 25(1): 99-121.
- Sotirova, V., Spasova, I., Galabova, N., Karpenko, E. & Shulga, A. (2008). Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram-negative bacterial strains. *Current Microbiology*, 56(6), 639-44.
- Torres, J. M. y Sánchez, J. A. (2001). Producción de un biosurfactante microbiano por *Torulopsis magnolinae* en cultivos sumergidos por carga. *Ciencia*, 9(3), 305-312.
- Tran H., Kruijt, M. & Raaijmakers, J. (2008). Diversity and Activity of Biosurfactant-Producing *Pseudomonas* in the Rhizosphere of Black Pepper in Vietnam *Journal of Applied Microbiology*, 104(3): 839-851.
- Van Hamme, J. D., Singh, A. & Ward, O. P. (2006). Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances*. 24: 604-620.
- Vargas, M. y Freer, E. (2002). Descripción morfológica y ultra estructural de floraciones nocivas en el Golfo de Nicoya y su impacto. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 23(4): 115-132.
- Vargas, M., Freer, E., Guzmán J. y Vargas, J. (2008). Florecimientos de dinoflagelados nocivos en la costa Pacífica de Costa Rica. *Hidrobiológica*, 18(1): 15-23.
- Wang, X., Gong, L., Liang, S., Han, X., Zhu, C. & Li, Y. (2005). Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Harmful Algae*: 4, 433-443.

