

# DETERMINACIÓN DE BACTERIOCINAS EN MUESTRAS DE CONSORCIOS MICROBIANOS NATIVOS DE ECOSISTEMAS DE MANGLAR EN EL DEPARTAMENTO DEL ATLÁNTICO, COMO FUENTE POTENCIAL DE NUEVOS TRATAMIENTOS BIOMÉDICOS

## BACTERIOCINS DETERMINATION OF SAMPLES OF MICROBIAL CONSORTIA NATIVE MANGROVE ECOSYSTEM IN THE DEPARTMENT OF ATLANTICO AS A POTENTIAL SOURCE OF BIOMEDICAL NEW TREATMENTS

Vanessa Galván Carbonó<sup>1</sup>  
Aracely García Cuán<sup>2</sup>

Universidad Libre de Barranquilla, Colombia

DOI: <https://doi.org/10.18041/2390-0512/bioc..1.2433>

### RESUMEN

Los manglares son ecosistemas con gran diversidad microbiana; la presión de sus condiciones físicas, se ha relacionado con la producción de metabolitos con estructuras moleculares únicas para los microorganismos. Dado el desarrollo de resistencia bacteriana a antimicrobianos a nivel mundial, se hace necesaria la búsqueda de nuevas soluciones que nos permitan contrarrestar los efectos de dichos patógenos.

En este estudio, se buscó aislar, identificar y evaluar la actividad antimicrobiana de bacteriocinas producidas por microorganismos nativos del ecosistema de manglar de la Ciénaga de Mallorquín, frente a microorganismos patógenos de interés clínico.

Se comprobó actividad antimicrobiana leve del extracto CN11, CN 8, P4C3, frente a *S. aureus* ATCC 25923, actividad antimicrobiana leve del extracto de P4C3 frente a *E. coli* BLEE, actividad antimicrobiana leve frente a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 de los extractos P4C3 y CN9; y actividad antimicrobiana moderada para el caso del extracto proteico de la cepa CN9 frente a *E. coli* ATCC 25922

**Palabras clave:** Bacteriocinas, Antimicrobianos, Saturación, Precipitación, Proteínas, Manglar.

### ABSTRACT

The mangroves are ecosystems of high primary productivity; they are rich in organic matter and have high microbial diversity. The pressure of the physical conditions of the mangrove ecosystems has been linked to the production of special metabolites and unique molecular structures for microorganisms. Because of the developing of microbial resistance to antimicrobials in the world, it is necessary the research of new solutions that allow to counteract the effect of those pathogens.

On this study, it was looking isolate, identify and evaluate the antimicrobial bacteriocins activity produced by native microbial consortia of mangrove swamp at the Mallorquin swamp, against pathogens microorganisms of clinical interest.

Mild antimicrobial activity of the extract CN11, CN 8, P4C3, was found against *S. aureus* ATCC 25923, mild antimicrobial activity of P4C3 extract was found against *E. coli* BLEE, mild antimicrobial activity of the extracts P4C3 y CN9 against *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603; moderate antimicrobial activity for protein extract of CN9 against *E. coli* ATCC 25922.

**Keywords:** Bacteriocins, Antimicrobial, Saturation, Precipitation, Proteins, Mangrove.

Recibido: 21/12/2016

Aceptado: 16-02.2017



1. Microbióloga, Especialista en Salud Ocupacional. Joven Investigador del Proyecto Colciencias. Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Medicina. Universidad Libre de Barranquilla. [vanessa0588@gmail.com](mailto:vanessa0588@gmail.com)
2. Bacterióloga, Especialista en Hematología, Msc. Biología Molecular y Biotecnología. Directora y tutora del Proyecto Colciencias. Jefe del Grupo IMB. Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Medicina. Universidad Libre de Barranquilla. [aracely.garciac@unilibre.edu.co](mailto:aracely.garciac@unilibre.edu.co)

### Cómo citar este artículo:

Galván Carbonó V, García Cuan A. determinación de bacteriocinas en muestras de consorcios microbianos nativos de ecosistemas de manglar en el departamento del atlántico, como fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. Biociencias [Internet]. 5ene.2017 [citado diames.año]; 12(1): 37-51. Available from: <http://revistas.unilibre.edu.co/index.php/biociencias/article/view/2433>

## INTRODUCCIÓN

Al final de la época dorada de la investigación en antibióticos, comprendida entre 1940 y 1960, el arsenal de compuestos descubiertos para el tratamiento de infecciones bacterianas en humanos hizo que esta investigación se detuviera por unos años.

Sin embargo, la aparición inmediata de mecanismos de resistencia en bacterias patógenas, incluyendo inactivación enzimática, modificación de dianas, formación de biofilms, entre otros, demostró que la búsqueda de compuestos antimicrobianos era necesaria y no debía ser interrumpida. No obstante, el progreso en el diseño de nuevos antimicrobianos para uso comercial ha sido lento, y esto, combinado con los múltiples y sofisticados mecanismos de resistencia bacterianos, ha generado una crisis en el tratamiento de muchas infecciones que fueron fácilmente tratables en un comienzo (2).

El desarrollo de resistencia bacteriana a antimicrobianos es un problema mundial que amenaza la salud pública. En países como Estados Unidos de Norteamérica el 64 % de las infecciones nosocomiales bacterianas son provocadas por Gram positivos y la resistencia a antibióticos ampliamente usados en su tratamiento es elevada (3). Colombia no escapa de la problemática de multiresistencia en bacterias, ya que se han informado niveles elevados de resistencia a cefalosporinas de tercera generación para *E. coli*.

La problemática de micosis y resistencia de hongos a antimicóticos actuales es otra situación que constituye un problema de salud pública en nuestro país, ocasionando infecciones intrahospitalarias y nosocomiales, es el caso de *Candida spp*, levadura

asociada a infecciones vulvovaginales en mujeres gestantes, particularmente *Candida albicans* como principal agente infeccioso, hallándose cepas resistentes a antimicóticos de uso terapéutico usual, como el Itraconazol (4).

Dado el fenómeno de resistencia microbiana, se hace menester la búsqueda de nuevas soluciones que nos permitan contrarrestar los efectos de dichos patógenos, de no hacerlo, estaríamos en una situación parecida a la de la etapa previa al descubrimiento de los antibióticos.

En nuestro planeta las extensiones de agua conforman alrededor del 71 % de la superficie total y en ellas las primeras formas de vida tuvieron su origen (5), no obstante, tan solo conocemos el 40 % de la biodiversidad que la habita. Los microorganismos marinos de ecosistema de manglar han despertado gran interés debido a su extraordinaria biodiversidad y capacidad biosintética.

Los manglares son ecosistemas de alta productividad primaria, ricos en materia orgánica. Esta productividad ha sido parcialmente explicada por la presencia de un eficiente sistema de reciclaje de nutrientes efectuado a través de la actividad microbiana. A su vez los exudados radicales de las plantas sirven como fuente de alimento para los microorganismos, estableciéndose así una relación mutuamente benéfica (6).

La continua búsqueda de antimicrobianos se ha dado en diferentes ecosistemas y organismos; los ambientes marinos han sido menos explorados comparados con los ambientes terrestres, lo que indica que las probabilidades de descubrir nuevas moléculas activas es mayor (1).

Los bosques de manglar se caracterizan porque en muchos casos, especialmente en los bosques caribeños tropicales, forman monocultivos naturales de alta densidad en donde los árboles están sujetos a una gran presión por enfermedades; no obstante, los registros de fitopatogenicidad en ecosistemas de manglar son raros (7).

La aparente sensibilidad de *Rhizophora* al ataque de patógenos y los escasos registros sobre patologías en árboles y plantas de manglar, pueden estar relacionados con la presencia de otros mecanismos que determinan la resistencia al ataque de patógenos (7).

Estudios de este tipo son escasos en el país, lo que se refleja en el desconocimiento del potencial biotecnológico de los microorganismos presentes en los ambientes marinos del territorio nacional, permitiendo así el desarrollo de una nueva área de investigación en Colombia. Con la búsqueda de compuestos bioactivos a partir de microorganismos marinos se favorece el aprovechamiento sostenible de ecosistemas marinos, debido a que su cultivo se realiza completamente *in vitro* y no se requiere la intervención o destrucción de ecosistemas.

Surge así la bioprospección orientada a la búsqueda y aprovechamiento de metabolitos secundarios producto de la actividad metabólica de consorcios microbianos marinos nativos de ecosistemas de manglar, de los cuales, estudios previos han logrado identificar bioactividad de estos compuestos con potencial terapéutico prometedor en la industria farmacéutica (8).

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Generalidades

Las áreas de manglar corresponden a la planicie

fluvio-marina en la zona costera del departamento del Atlántico, ocupan un área de 613,3 ha en todo el departamento, distribuidas entre los ambientes estuarinos litorales de las ciénagas de Mallorquín, Manatías, El Rincón, Balboa, Totumo y el sector de La Represa y a lo largo de la línea de costa en los sectores de Astilleros, Bocatocino, Punta de Morro Pelao, Cerro Punta de Piedra, Santa Verónica, Rincón Hondo, Punta Velero, Playa Turipaná y Punta de Morro Hermoso, asociados a otros ambientes como playas y arroyos que desembocan en el mar (9).

El nombre de manglar proviene de la palabra mangle, árbol que es el principal constituyente de su ecosistema. Los ecosistemas de manglar cubren aproximadamente el 60 o 75 % de la línea costera mundial (10).

Los manglares son el equivalente costero del bosque selvático en tierra. Constituyen un ecosistema insustituible y único, que alberga una gran biodiversidad. Entre sus árboles, ramas y follaje se encuentran muchas especies de aves, reptiles, mamíferos, insectos, plantas epifitas, líquenes, hongos, bacterias (10).

Los manglares son ecosistemas costeros que proveen un amplio rango de servicios ecológicos, albergan una gran diversidad de especies de organismos, además, sirven como protección de la zona costera contra huracanes e inundaciones, por ello la importancia de su conservación y preservación (10).

### 1.2. Organismos marinos como fuente de compuestos bioactivos

Las poblaciones microbianas, en general, producen compuestos que desfavorecen el crecimiento de

otras poblaciones, tales como ácido láctico, ácidos grasos, ácido sulfúrico, amoníaco, etanol u otros alcoholes de bajo peso molecular. Los antibióticos, producidos de forma natural por estas poblaciones, podrían suministrar beneficios en el control de enfermedades, tanto en acuicultura como en patología humana y animal (12); en este contexto los microorganismos acuáticos se están incorporando como potenciales productores de fármacos con nuevos modos de acción (11).

Los organismos marinos representan un arsenal de nuevas y novedosas sustancias, de una increíble diversidad. Esta variedad de estructuras químicas pueden ser utilizadas como herramientas para la síntesis de nuevas moléculas, con el fin de desarrollar productos útiles en la industria farmacéutica y agrícola (12).

Dentro de la diversidad del metabolismo microbiano, existen bacterias capaces de sintetizar péptidos a nivel ribosómico que pueden sufrir modificaciones post-traduccionales y tienen efecto antagónico contra microorganismos con o sin relación filogenética (13).

Es imposible comprender los mecanismos de desarrollo y sostenimiento del ecosistema de manglar sin abordar el estudio de su microbiología, ya que esta resulta fundamental para su mantenimiento y constituye un verdadero universo de diversidad filogenética y metabolismo funcional (14).

Se han realizado algunas investigaciones sobre la comunidad microbiana de manglar en Bahía Balandra, California, como bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN), desnitrificantes, solubilizadoras de fosfatos (BSF), sulfato reductoras, productoras de moléculas señal, de sustancias reguladoras de cre-

cimiento vegetal y productoras de antibióticos. Estas investigaciones apoyan la hipótesis que la existencia de estos grupos es de vital importancia para el funcionamiento del ecosistema (14).

Algunos estudios se han enfocado al aislamiento de grupos bacterianos y la evaluación de su importancia en procesos como la fijación de nitrógeno atmosférico, desnitrificación y solubilización de fosfato inorgánico. Actualmente, se han emprendido investigaciones sobre síntesis de antibióticos en la rizósfera de los mangles y la presencia de moléculas señal tipo acil homoserina lactonas o AHLs producidas por bacterias, así como su posible relación con los procesos fisiológicos que promuevan el crecimiento vegetal (14).

Los hongos marinos constituyen un grupo de microorganismos capaces de biosintetizar metabolitos con estructuras novedosas (15).

Los antibióticos, producidos de forma natural por estas poblaciones, podrían suministrar beneficios en el control de enfermedades, tanto en acuicultura como en patología humana y animal (16); en este contexto los hongos tropicales se están incorporando a los programas de preselección como potenciales productores de fármacos con nuevos modos de acción (11).

Las investigaciones realizadas por Lin y cols en 2002, Chen y cols en 2003, Krohn y Riaz en 2004 revelaron la presencia de metabolitos secundarios provenientes de los hongos marinos, aislados de mangles, entre ellos: *Verruculina enalia* 2606, *Kandelia candel* 1893 y *Xylaria* sp., con potentes y diversas actividades: antifúngicas, antitumorales, e inhibitorias de la acetilcolina esterasa, respectivamente (17).

Esto es indicativo de que los manglares y los sedimentos asociados a estos ecosistemas, representan microambientes importantes para el aislamiento de hongos marinos productores de metabolitos con actividad antifúngica u otras propiedades bioactivas (8).

### 1.3. Técnicas de susceptibilidad a antibióticos

Existen cuatro técnicas básicas diseñadas para determinar la existencia de actividad antimicrobiana de una sustancia: Técnica de dilución en caldo, Técnica de dilución en agar, Microtécnica de dilución en caldo y Prueba de susceptibilidad de Kirby-Bauer o técnica de difusión en agar (18).

#### ***Prueba de susceptibilidad de Kirby-Bauer o técnica de difusión en agar (Hewitt y Vincent, 1989) (18)***

Este es un método cualitativo que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable y que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. Partiendo de una muestra clínica siempre se debe realizar un cultivo puro para poder comenzar el estudio de la sensibilidad antibiótica. Para esto se utiliza la técnica de aislamiento en placas que contengan un medio adecuado para la cepa en estudio (al cual además se le deben otorgar las condiciones atmosféricas específicas de esa cepa).

El antibiograma por disco difusión basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores, es uno de los métodos que el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos (18).

En este método se coloca de manera uniforme un inóculo estándar del microorganismo en una caja de Petri que contenga agar Mueller-Hinton. Se permite que la sustancia activa difunda a partir de una

solución acuosa desde una fuente hasta el agar. Se puede realizar en tubo de ensayo, en placas de Petri o en platos cuadrados (30 cm de lado). Cuando se usan placas de Petri, las diluciones de antibióticos o soluciones de prueba se aplican de diferentes formas dependiendo del tipo de fuente usada, así, la solución es adicionada a pozos o cilindros hechos sobre el agar por medio de una pipeta, o puede aplicarse en discos de papel, los cuales después son colocados sobre las placas con agar.

Así que sobre la superficie de agar previamente inoculada con el organismo por estudiar, se colocan estos discos de papel de filtro impregnados con el antibiótico. El antibiótico difunde del disco hacia el agar, produciéndose zonas de inhibición de desarrollo alrededor de aquellos discos que contienen antibióticos a los cuales los organismos estudiados son susceptibles (18).

### 1.4. Bacteriocinas: Generalidades

El término “bacteriocinas” fue propuesto por primera vez por Jacob y colaboradores en 1953 para referirse a las sustancias proteicas con actividad antimicrobiana de origen bacteriano, luego Tagg y cols en 1976 las definieron como un grupo de sustancias antimicrobianas de origen bacteriano, caracterizadas por poseer un componente proteico biológicamente activo y por ejercer un modo de acción bactericida (19).

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidos por un gran número de bacterias, incluyendo bacterias ácido lácticas.

Normalmente actúan contra microorganismos no deseados o patógenos, estrechamente relacionados o responsables del deterioro y causantes de enfermedades (19).

Por esta razón, se utilizan en varias aplicaciones, entre las que se encuentran la biopreservación, la extensión de la vida útil, la acción antimicrobiana clínica (20).

La producción ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa producida (21).

Las bacteriocinas comprenden un grupo grande y diverso de proteínas o péptidos antimicrobianos sintetizados ribosómicamente, algunos de los cuales se someten a modificaciones post-traduccionales, que tienen un efecto bactericida o bacteriostático en otras bacterias ya sea de la misma especie (espectro estrecho) o de otros géneros (espectro amplio). La célula productora sintetiza una molécula que la inmuniza contra la propia bacteriocina (21).

#### **1.4.1. Métodos de purificación de bacteriocinas**

El primer paso que se requiere para la purificación de las bacteriocinas se refiere a la concentración del sobrenadante, asumiendo un proceso de producción de bacteriocinas optimizado (22). Algunas de ellas se encuentran en agregados moleculares; estas macromoléculas se disgregan usando agentes que disocian las macromoléculas, ultrafiltración o eliminando material lipídico por la extracción con metanol – cloroformo o etanol – dietil éter. Las bacteriocinas del sobrenadante pueden ser concentradas de acuerdo con su tamaño por filtración; precipitación con sales de sulfito de amonio; y extracción con solventes orgánicos como butanol y etanol (22).

## **2. METODOLOGÍA**

### **2.1. Identificación del sitio de muestreo**

El sitio de muestreo corresponde a la zona de eco-

sistema de manglar de la Ciénaga de Mallorquín del departamento del Atlántico.

Debido a que los microorganismos no se encuentran distribuidos uniformemente de acuerdo a sus actividades biológicas, se dividió la extensión del ecosistema en parcelas de 10x10m sobre un transecto de 100 m<sup>2</sup>, de acuerdo a esto quedó subdividido en 7 parcelaciones, donde se tomó la muestra de sedimento rizosférico y agua del ecosistema (9).

### **2.2. Procesamiento de muestras**

Las muestras de agua del ecosistema de manglar, fueron filtradas utilizando tres tamices diferentes, en primera instancia, gasa estéril; en segunda instancia, papel de filtro WHATMAN; en tercera instancia se realizó filtración con equipo de filtración de membranas de 0,45 µm.

El agua filtrada se esterilizó posteriormente y se utilizó en la preparación de medios de cultivo.

Los microorganismos fueron aislados a partir de 5 gr de sedimento rizosférico diluido en 45 ml de caldo nutritivo preparado con agua filtrada estéril de mangle.

Se realizaron diluciones en base 10 (en caldo nutritivo preparado con agua del ecosistema de manglar filtrada y esterilizada) tomando 1 ml de la primera dilución hasta llegar a la dilución 10<sup>-3</sup>. Las diluciones fueron sembradas en profundidad por triplicado en agar nutritivo y agar MRS, preparados con agua filtrada estéril de mangle mediante la técnica de vaciado en placas.

Una vez realizada la siembra microbiológica, las cajas de Petri fueron incubadas a 37°C. La purificación o aislamiento microbiano se realizó mediante

resiembras a tríos consecutivas por agotamiento en agar MRS y agar nutritivo. Se empleó un control para los medios de cultivo, el cual consistió en caldo nutritivo estéril.

### 2.3. Identificación macroscópica y microscópica de los morfotipos

La identificación macroscópica de las cepas aisladas se realizó mediante los criterios de forma, tamaño, color, textura y elevación de las colonias de acuerdo a lo estipulado en el Manual Bergey en 1986, y de Dellaglio y cols en 1994 y la microscópica basada en la utilización de la coloración diferencial de Gram.

**Identificación bioquímica de los géneros microbianos:** Para la identificación de los géneros microbianos, las cepas puras seleccionadas se les aplicarán pruebas bioquímicas utilizando el kit comercial BBL Crystal.

### 2.4. Obtención y purificación parcial de bacteriocinas

Una vez seleccionadas las cepas candidatas para realizar el método de obtención y purificación parcial de bacteriocinas, se preparó un cultivo de 24 horas de la cepa estudio.

Una vez se tiene el cultivo de 24 horas de la cepa estudio, a partir de colonias aisladas crecidas en agar nutritivo estándar (BD Bioxón), se tomó una colonia y se inoculó en 3.0 ml de caldo nutriente (BD Bioxón), posterior a esto, se incubó a 37°C durante 24 horas. De este preinóculo se transfirieron 0.5 mL en 100 mL de caldo nutritivo y se cultivó durante 24 h.

Luego de lo anterior, se realizó separación de células por centrifugación (2.500 rpm durante 2 horas). El sobrenadante obtenido fue guardado en refrige-

ración para las siguientes sesiones.

Para la obtención del extracto enzimático se realizó precipitación fraccionada con sulfato de amonio a 20 %, 40 %, 60 % y a 80 % de saturación (22).

Las fracciones obtenidas en la precipitación fueron dializadas contra un regulador tris-HCl 0.2 M, pH 8.5, a 5°C durante 48 h con cambios continuos del regulador.

Una vez dializadas las muestras, se realizó el método de Lowry para cuantificar proteínas (22).

#### 2.4.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de la sustancia bioactiva de las cepas microbianas obtenidas, se usaron cepas de referencia ATCC liofilizadas de *Escherichia coli* ATCC 22922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Candida albicans* ATCC10231, *Listeria monocitogenes* ATCC 7644, *E. coli* BLEE positivas y *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Se usaron cultivos de 18-24 horas en caldo nutritivo (pH 6.5±0.2 a 25°C) de las cepas de referencia mencionadas. Se determinó la concentración del caldo a sembrar según metodología de Kirby-Bauer, por comparación de la turbidez del tubo con el estándar No. 0.5 de McFarland (18).

Para evaluar el espectro de la actividad antimicrobiana se utilizó el método de difusión en agar usando agar Mueller-Hinton, según metodología de Hewitt y Vincent en 1989; se tomaron alícuotas de 0.2 ml de cada cultivo bacteriano para inocular en 15 ml de agar Mueller-Hinton fundido a una temperatura de 45°C (pH 7.4± 0.2 a 25°C), se mezcló

por inversión el tubo, posteriormente se dispensó el agar en cajas de Petri de 10 cm de diámetro (23).

Luego de la solidificación del agar se procedió a depositar los discos impregnados con diferentes sustancias: Como controles positivos para las bacterias utilizadas en este estudio, se usaron sensidiscos comerciales de: Cefoperazona OXOID® (75 µg), cefalosporina de tercera generación que muestra buena actividad bactericida para *Estafilococos* y *Enterobacterias*; y el Imipenem (carbapenem), la droga de elección para el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias productoras de Betalactamasa de espectro extendido (BLEE).

Como control positivo para *Candida albicans* se usaron sensidiscos impregnados con 20 µl de Nistatina comercial en suspensión LA SANTÉ® (2,273 g/ml), por ser ampliamente utilizado en el tratamiento de diferentes tipos de candidiasis (24).

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos se utilizaron discos de papel filtro WHATMAN previamente esterilizados, los cuales fueron impregnados con 20 µl, de las diferentes fracciones obtenidas en la precipitación con sulfato de amonio (20 %, 40 %, 60 % y 80 % de saturación). Además se utilizaron discos de papel filtro limpios como control negativo.

Posterior a este procedimiento las cajas fueron incubadas a 35°C por 24 hora para proceder a leer los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento microbiano generados alrededor de los discos impregnados con los extractos y el de los sensidiscos comerciales (control positivo). Se realizaron dos lecturas una a las 24 horas de incubación y otra a las 48 horas de incubación.

Para evaluar la validez de los resultados se hicieron para cada microorganismo tres réplicas, para evitar sesgos en los resultados. Además se testeó con cepas comerciales ATCC Thermo Scientific Culti-Loops OXOID®, con las que se realizó el control de calidad a los sensidiscos comerciales impregnados con diferentes antibióticos, y usados para medir el perfil fenotípico de resistencia de las bacterias a diferentes antimicrobianos.

Para evaluar la actividad antibacteriana se consideraron las siguientes categorías propuestas por Monks y cols en 2002 (25):

- (-) No hay actividad
- (+) Actividad leve, halo de inhibición entre 7-11 mm
- (++) Actividad moderada, halo de inhibición entre 11-16 mm
- (+++) Actividad fuerte, halo de inhibición mayor a 16 mm

### 3. RESULTADOS

Se realizaron en total 5 extractos proteicos de bacteriocinas provenientes de 5 cepas nativas del ecosistema de manglar. Las cepas fueron identificadas según nomenclatura interna del laboratorio como CN9, CN10, CN11, P4C3 y CN8.

La cepa CN9 fue identificada por prueba bioquímica con kit BBL Crystal como 97,38 % *Leuconostoc pseudomesenteroides*. La mayor concentración de sustancia peptídica se obtuvo con un 20 % de saturación de sulfato de amonio (0,73 mg/ml) y la menor concentración de sustancia peptídica se obtuvo con un 80 % de saturación de sulfato de amonio (0,4 mg/ml). Se observó un índice de actividad antimicrobiana (IA) de 75 % para *E. coli* ATCC 22922 y

un índice de actividad antimicrobiana (IA) de 16,6 % del extracto CN9 frente a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Según las categorías propuestas por Monks y cols en 2002, se observó actividad antimicrobiana moderada frente a *E. coli* ATCC 22922 en una de las tres réplicas de la fracción de 20 % y en una de las tres repeticiones de la fracción de 80 % de saturación con sulfato de amonio, en las otras dos repeticiones se observó actividad antimicrobiana leve.

Se observó actividad antimicrobiana leve en las fracciones de 40 % y 60 % de saturación con sulfato de amonio frente a *E. coli* ATCC 22922.

Para el caso de la actividad del extracto de CN9 frente a la cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 se evidenció actividad antimicrobiana moderada en una de las tres repeticiones de la fracción de 40 % de saturación con sulfato de amonio y actividad antimicrobiana leve en una de las tres réplicas de la fracción de 60 % de saturación con sulfato de amonio.

**Tabla 1. Valores promedios, medianas de los diámetros de los halos de inhibición presentados en bacterias susceptibles al extracto de la cepa CN9**

Extracto	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>E. coli</i> ATCC	
	X± DS	MED	X± DS	MED
CN9	10 ±2,82	10	9,55 ± 2,29	9

Fuente: Las autoras

Donde:

CN9: Nomenclatura interna del laboratorio; X: Promedio; DS: Desviación Estándar; MED: Mediana.

*Nota: los valores promedios se encuentran dados en mm.*

La cepa CN8 fue identificada por prueba bioquímica con kit BBL Crystal como 84,58 % *Bacillus cereus*. La mayor concentración de sustancia peptídica se obtuvo con un 20 % de saturación de sulfato de amonio (0,95mg/ml) y la menor concentración de sustancia peptídica se obtuvo con un 80 % de saturación de sulfato de amonio (0,46 mg/ml). Se observó un índice de actividad antimicrobiana (IA) de 58,3 % frente a *S. aureus* ATCC 25923. Se evidenció actividad antimicrobiana leve frente a *S. aureus* ATCC 25923 en las tres réplicas de la fracción de 20 % de saturación con sulfato de amonio, se observó actividad antimicrobiana leve en uno de los tres casos estudiados de las fracciones de 40 % y 60 % de saturación frente a *S. aureus* ATCC 25923 y actividad antimicrobiana leve en uno de los casos estudiados de las fracciones de 40 % y 60 % frente a *S. aureus* ATCC 25923.

**Tabla 2. Valores promedios, medianas de los diámetros de los halos de inhibición presentados en bacterias susceptibles al extracto de la cepa CN8**

Extracto	<i>S. aureus</i> ATCC	
	X± DS	MED
CN8	9,57±1,13	9

Fuente: Las autoras

Donde:

CN8: Nomenclatura interna del laboratorio; X: Promedio; DS: Desviación Estándar; MED: Mediana.

*Nota: los valores promedios se encuentran dados en mm.*

La cepa CN11 no fue posible identificarla. Lo anterior puede deberse al hecho de que el sistema BBL Crystal para la identificación (ID) de bacterias gram-positivas (GP) es un método de identificación que se ha diseñado para la identificación de bacterias aerobias gram-positivas para grupos taxonómicos

suministrados aisladas frecuentemente de muestras clínicas. Por lo que lo más probable es que nuestra cepa proveniente de sedimento rizosférico de manglar, no se encuentre dentro de los grupos taxonómicos para los cuales está diseñada la identificación con el *kit*.

La mayor concentración de sustancia peptídica se obtuvo con un 20 % de saturación de sulfato de amonio (0,73 mg/ml) y la menor concentración de sustancia peptídica se obtuvo con un 80 % de saturación de sulfato de amonio (0,55 mg/ml). Se observó un índice de actividad antimicrobiana (IA) de 58,3 % frente a *S. aureus* ATCC 25923. Se evidenció actividad antimicrobiana leve frente a *S. aureus* ATCC 25923 en las tres réplicas de la fracción de 20 % de saturación con sulfato de amonio, se observó actividad antimicrobiana leve en uno de los tres casos estudiados de las fracciones de 40 % y 80 % de saturación frente a *S. aureus* ATCC 25923 y actividad antimicrobiana leve en dos de los casos estudiados de las fracciones de 60 % frente a *S. aureus* ATCC 25923.

**Tabla 3. Valores promedios, medianas de los diámetros de los halos de inhibición presentados en bacterias susceptibles al extracto de la cepa CN11**

Extracto	<i>S. aureus</i> ATCC	
	X± DS	MED
CN11	8,43 ±1,13	9

Fuente: Las autoras

Donde:

CN11: Nomenclatura interna del laboratorio; X: Promedio; DS: Desviación Estándar; MED: Mediana.

*Nota: los valores promedios se encuentran dados en mm.*

La cepa CN10 fue identificada por prueba bioquímica con kit BBL Crystal como *Enterococcus raffinosus* 95,68 %.

La mayor concentración de sustancia peptídica se obtuvo con un 20 % de saturación de sulfato de amonio (0,54 mg/ml) y la menor concentración de sustancia peptídica se obtuvo con un 80 % de saturación de sulfato de amonio (0,15 mg/ml). Se observó un índice de actividad antimicrobiana (IA) de 75 % frente a *E. coli* BLEE.

Se evidenció actividad antimicrobiana leve en los tres casos de estudio de las fracciones de 60 % y 80 % de saturación con sulfato de amonio frente a *E. coli* BLEE positivas y actividad antimicrobiana leve en dos de los casos de estudio del extracto de 20 % de saturación frente a *E. coli* BLEE positivas y actividad antimicrobiana leve en uno de los casos de estudio de la fracción de 40 % de saturación con sulfato de amonio frente a *E. coli* BLEE positivas.

**Tabla 4. Valores promedios, medianas de los diámetros de los halos de inhibición presentados en bacterias susceptibles al extracto de la cepa CN10**

Extracto	<i>E. coli</i> BLEE	
	X± DS	MED
CN10	9,11 ± 1,36	9

Fuente: Las autoras

Donde:

CN10: Nomenclatura interna del laboratorio; X: Promedio; DS: Desviación Estándar; MED: Mediana.

*Nota: los valores promedios se encuentran dados en mm.*

La cepa P4C3 fue identificada por prueba bioquímica con kit BBL Crystal como *Corynebacterium diphtheriae* 97,81 %.

La mayor concentración de sustancia peptídica se obtuvo con un 20 % de saturación de sulfato de amonio (0,66 mg/ml) y la menor concentración de sustancia peptídica se obtuvo con un 60 % de saturación de sulfato de amonio (0,06 mg/ml). Se observó un índice de actividad antimicrobiana (IA) de 25 % frente a *E. coli* BLEE, 16 % frente a *S. aureus* ATCC 25923 y un IA de 8,3 % frente a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Se evidenció actividad antimicrobiana leve en los tres casos de estudio de la fracción de 20 % frente a *E. coli* BLEE, así como también actividad antimicrobiana leve frente a *S. aureus* ATCC 25923 y actividad antimicrobiana leve de esta fracción del extracto frente a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 en uno de los casos de estudio.

**Tabla 5. Valores promedios, medianas de los diámetros de los halos de inhibición presentados en bacterias susceptibles al extracto de la cepa P4C3**

Extracto	<i>E. coli</i> BLEE		<i>S. aureus</i> ATCC		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	X± DS	MED	X± DS	MED	X± DS	MED
P4C3	9,11 ± 1,36	9	8,5±0,70	8,5	7,66±0,57	8

Fuente: Las autoras

Donde:

P4C3: Nomenclatura interna del laboratorio; X: Promedio; DS: Desviación Estándar; MED: Mediana.

*Nota: los valores promedios se encuentran dados en mm.*

#### 4. DISCUSIÓN

Los microorganismos marinos, por su abundancia y diversidad, constituyen una fuente potencial de nuevos fármacos. Estos organismos, al igual que las restantes formas marinas, al estar en un medio tan competitivo, desarrollan estrategias de defensa y

ataque ante las agresiones del medio, produciendo de esta forma, sustancias con actividad antibiótica (26).

Actualmente hay pocos estudios orientados a la búsqueda de compuestos bioactivos a partir de grupos bacterianos nativos de ecosistema de manglar, sin embargo encontramos investigaciones realizadas por Lin y cols en 2002, Chen y cols en 2003, Krohn y Riaz en 2004 que revelan la presencia de metabolitos secundarios provenientes de los hongos marinos, aislados de mangles, entre ellos: *Verruculina enalia* 2606, *Kandelia candel* 1893 y *Xylaria* sp., con potentes y diversas actividades: antifúngicas, antitumorales, e inhibitorias de la acetilcolina esterasa, respectivamente (27).

Las bacteriocinas son péptidos sintetizados por bacterias ácido lácticas que se caracterizan por su capacidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos, al revisar otros estudios cuyo objetivo era la obtención y purificación de bacteriocinas encontramos que las cepas bacterianas de las cuales se obtiene el compuesto bioactivo provienen de otros escenarios de la naturaleza diferentes al ecosistema de manglar, sea por ejemplo a partir de maíz, carne animal (cerdo, pescados), cultivos de fresa, así por ejemplo, tenemos que Del Rosario y cols, aislaron una cepa de *Bacillus subtilis* productora de bacteriocinas, a partir de cultivos de fresa de la región de Irapuato (México).

Minor y cols (28) aislaron la cepa *Lactobacillus buchnerii* productora de bacteriocina a partir de carne de cerdo. Muñoz en 2012; aisló cepas nativas de *Lactobacillus* productoras de bacteriocinas a partir de ensilaje de maíz y melaza (29).

En esta investigación se logró obtener sustancias

bioactivas de naturaleza peptídica (bacteriocinas) a partir de cinco cepas microbianas del ecosistema de Manglar de la Ciénaga de Mallorquín ubicada en su totalidad en el extremo norte del distrito de Barranquilla, sobre la margen izquierda de la desembocadura del río Magdalena (Bocas de Ceniza) en el mar Caribe, en la costa Caribe colombiana.

Existen reportes de la obtención de bacteriocinas de *L. mesenteroides* a concentraciones de 50 % (Xiraphi y cols, 2008), 70 % (Todorov, 2004) (Amorteguí, 2012) de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , entre otros autores, sin embargo, en la presente investigación se logró la mayor obtención de bacteriocinas de las cepas estudiadas (CN9, CN11, CN8 y P4C3) al 20 % de concentración de sulfato de amonio. Lo anterior es similar a lo reportado por Mondragón-Preciado y cols en 2014, quienes obtuvieron bacteriocinas de *L. mesenteroides* a 30 % de concentración de sulfato de amonio (30).

En cuanto a la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas se observó actividad moderada del extracto de la cepa CN9 identificada como *Leuconostoc pseudomesenteroides* (97,38 %), frente a *E. coli* ATCC 22922 con halos de inhibición de 14 mm. Otros autores han reportado halos de inhibición con diámetros mayores mostrando actividad antimicrobiana fuerte de bacteriocinas producidas por otras cepas de *Leuconostoc*, como es el caso del trabajo realizado por Mondragón-Preciado y cols en 2014 (30), quienes reportaron actividad antimicrobiana fuerte con halos de 18 mm frente a *E. coli*.

Por otro lado, la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas de la cepa CN9 es significativa comparable a la del control que es un antibiótico purificado de amplio espectro (Imipinem), con el cual se evidenció actividad antimicrobiana moderada,

lo cual potencializa su uso en contra de microorganismos patógenos.

Se comprobó actividad antimicrobiana leve del extracto CN11, CN8, P4C3, frente a *S. aureus* ATCC 25923, actividad antimicrobiana leve del extracto de P4C3 y CN10 frente a *E. coli* BLEE, actividad antimicrobiana leve de los extractos P4C3 y CN9 frente a *Klebsiella pneumoniae*.

## 5. CONCLUSIONES

Se realizó purificación parcial de sustancia bioactiva de las cepas CN11, CN8, P4C3 y CN9.

La mayor obtención de sustancia bioactiva de las cepas estudiadas (CN9, CN11, CN8 y P4C3) se logró al 20 % de concentración de sulfato de amonio.

La fracción de 20 % de la cepa CN9 es más activa que las demás fracciones del extracto proteico de esta cepa ya que presentó mayor relación halos de inhibición/concentración de proteína.

Los extractos de las cepas CN11, CN8, P4C3 presentaron actividad antimicrobiana leve frente a *S. aureus* ATCC 25923, los extractos de las cepas CN 10 y P4C3 mostraron actividad antimicrobiana leve frente a *E. coli* BLEE, y se evidenció actividad antimicrobiana leve de los extractos P4C3 y CN9 frente a *Klebsiella pneumoniae*.

Los resultados obtenidos ameritan continuar su estudio con otras cepas bacterianas y fúngicas, así como trabajar en la purificación de la sustancia bioactiva a fin de obtener mayor concentración de proteína y mayor nivel de pureza, lo que nos permita muy probablemente obtener mayores halos de inhibición frente a los microorganismos indicadores.

Cabe resaltar que la actividad antimicrobiana presentada por los extractos de las cepas CN10 y P4C3 frente a *E. coli* BLEE positiva, representa un hallazgo significativo dado que la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en las enterobacterias se ha encontrado asociada a la capacidad de hidrolizar varios antimicrobianos, incluso de familias diferentes a los betalactámicos, por lo que la actividad antimicrobiana presentada por los extractos de las cepas CN10 y P4C3 pueden representar a futuro nuevas alternativas de tratamientos antimicrobianos. Además puesto que la actividad antimicrobiana presentada para estos dos extractos en mención frente a *E. coli* BLEE positiva es una actividad antimicrobiana leve, se sugiere para próximos estudios optimizar el método de extracción de bacteriocinas ya que según algunos autores, el protocolo de purificación utilizado está directamente relacionado con el grado de pureza de la bacteriocina y su espectro de actividad antimicrobiana.

La valoración de la actividad citotóxica y genotóxica de productos naturales se ha convertido en métodos de uso muy frecuente en los últimos años como parte de un largo y arduo proceso de evaluación y desarrollo de un nuevo medicamento. Teniendo en cuenta los resultados del presente estudio, es importante llevar a cabo investigaciones de citotoxicidad y genotoxicidad, para determinar y caracterizar el posible uso farmacológico que pudiese darse a los extractos o a su fracción activa en seres humanos o animales.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hugues C, Fenical W. Antibacterial from the sea. *Chemistry a European Journal*.

2010;10. En: [http://www.readcube.com/articles/10.1002%2Fchem.201001279?r3\\_referer=wol&tracking\\_action=preview\\_click&show\\_checkout=1](http://www.readcube.com/articles/10.1002%2Fchem.201001279?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1)

2. Romero D, Traxler M, López D, Kolter R. Antibiotics as signal molecules. *Chemical reviews*. 2011;111(9):5492-5505.

3. Morfin Otero, Rangel F, Rodríguez Noriega. La evolución de la Resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomédica*. 2014;34(1):181-190. En: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84330489021>

4. Duque Beltrán C. Búsqueda de compuestos bioactivos, a partir de organismos marinos del Caribe colombiano. *Rev. Acad. Colomb. Cienc*. 1998;22(85):527-537.

5. De la Rosa García S., Gamboa Angulo M. Microorganismos acuáticos, una farmacia por visitar. *Rev. Ciencia Ergo Sum*. 2004;11(002):186-190.

6. Holguín G. La microbiología de los manglares; 1999. Disponible en <http://www.bas-hanfoundation.org/gmaweb/pdfs/la-microbiol.pdf>

7. Sosa Rodríguez T, Sánchez Nieves J, Melgarejo LM. Papel funcional de los hongos en ecosistemas de manglar. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR*. 2009;38(1):39-57.

8. Castillo Machalskis I. Actividad antibacteriana de extractos de hongos aislados de raíces del mangle *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) en Venezuela. *Rev. biol. Trop*. 2006;55(3-4). Versión impresa ISSN 0034-7744. Disponible en: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-77442007000300002](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442007000300002)

9. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVEMAR). Actualización y ajuste del

- diagnóstico y zonificación de los manglares de la zona costera del departamento del Atlántico, Caribe colombiano. Informe Final. Editado por: A. López y P.C. Sierra-Correa. Santa Marta: INVEMAR – CRA; 2005. p.191 + 5 anexos.
10. Holguín G. La microbiología de los manglares; 1999. Disponible en: <http://www.bas-hanfoundation.org/gmaweb/pdfs/la-microbiol.pdf>
  11. De la Rosa García S, Gamboa Angulo M. Microorganismos acuáticos, una farmacia por visitar. Rev. Ciencia Ergo Sum. 2004;11(002):186-190.
  12. Hernández y Hernández. Bioactivos marinos en Venezuela: una revisión. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. 2005;17(2):188-194.
  13. De La Fuente Salcido NM. Biosíntesis y actividad de bacteriocinas producidas por cepas mexicanas de bacillus thuringiensis con potencial aplicación como bioconservadores en alimentos; 2009. Disponible en: [http://eprints.uanl.mx/2502/1/Biosintesis\\_y\\_actividad\\_de\\_bacteriocinas.pdf](http://eprints.uanl.mx/2502/1/Biosintesis_y_actividad_de_bacteriocinas.pdf)
  14. Pico F. Los manglares de la Península de Baja California. Primera edición 2011 D.R. © Publicación de divulgación del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita. La Paz, Baja California Sur, México, 23090. ISBN 978-607-7634-06-5.
  15. Atlas R., Bortha R. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Addison Wesley Person Education, Madrid; 2002. p.677.
  16. Lodeiros C, Espin A, Ordaz Y, González C. Actividad antibiótica de bacterias marinas ante bacterias patógenas de humanos. Act. Cient. Venez. 1989;40:254-6.
  17. Acosta M. et al. Actividad biológica de extractos en acetato de etilo de los hongos fusarium camptoceras wollenw y reinking y aspergillus flocculosus frisvad y samson, aislados de ambientes marinos. Bol. Invest. Mar. Cost. 2011;40(1):25-39. ISSN 0122-9.
  18. Koneman E. et.al. Diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color. 6ta edición. Buenos Aires: Médica Panamericana. 1696 p. ISBN: 978-950-06-0895-4.
  19. Rojas C, Vargas P. Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria Tecnología en Marcha. 2008;21-2:9-16.
  20. Balciunas ME, Castillo Martínez FA, Dimitrov ST, Gombossy de Melo Franco BD, De Souza Oliveira RP. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. Food Control. 2013;32:134-142.
  21. Vásquez SM, Suárez H, Zapata S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. Revista Chilena de Nutrición. 2009;36(1):64-71.
  22. Svetoslav T, Vaz-Velho M, Gibbs P. Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocina produced by Lacto-bacillus plantarum ST31, Brazilian J. of Micro-biol. 2004;35:157-160.
  23. Hewitt W, Vincent S. 1989. The agar diffusion assay. 38-79. In Hewitt W. y Vincent S. (Eds.). Theory and application of microbiological assay, San Diego: Academic Press; 1989. p.323.
  24. Fernández Andreu CM. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”. “Sensibilidad in vitro a la nistatina de aislamientos vaginales de Candida spp”. Rev Cubana Med Trop. 2001;53(3):194-8.
  25. Monks NR, Lerner C, Henriques A, Farias

- F, Schapoval E, Suyenaga E, Da Rocha A, Schwartzmann G, Mothes B. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2002;(281):1-12.
26. Hernández y Hernández. "Bioactivos marinos en Venezuela: una revisión". Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. 2005;17(2):188-194.
27. Castillo Machalskis I. Actividad antifúngica de extractos crudos de hongos marinos aislados de raíces del mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.). *Bol. Centro Invest. Biol.* 40(1).
28. Del Rosario M. Barbosa Corona, J.E. Salcedo Hernández R. Vásquez Arista M. Basurto Cadenas M.G. Producción de proteasas y bacteriocinas por la cepa mexicana *Bacillus subtilis* No. 21 contra hongos y bacterias patógenas en alimentos. Disponible en: [www.respyn.unal.mx/especiales/2008/ee-08-2008/.../A025.pdf](http://www.respyn.unal.mx/especiales/2008/ee-08-2008/.../A025.pdf)
29. Muñoz Caicedo MN. Estudio del efecto de los fructooligosacáridos en la producción de bacteriocinas por aislados nativos de *Lactobacillus* spp; 2012. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/8966/1/01107464.2012.pdf>
30. Mondragón-Preciado G. Identificación de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas aisladas de tuba. XIX Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica; 2014. Disponible en: [cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/235/1/cristobal\\_dr.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/235/1/cristobal_dr.pdf)