

**Centro de Investigación Científica y de
Educación Superior de Ensenada**



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE
CIANOBACTERIAS MARINAS PRODUCTORAS
DE COMPUESTOS DE INTERES BIOMEDICO**

**TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS**

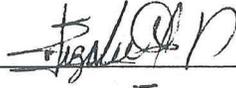
ALEJANDRA TORRES ARINO

ENSENADA, B. C., ABRIL DEL 2001.

TESIS DEFENDIDA POR

Biól. Alejandra Torres Ariño

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



Dra. Elizabeth Ponce Rivas

Director del comité



M.C. Graciela Guerra Rivas

Miembro del comité



Dr. José de Jesús Paniagua Michell

Miembro del comité



Dr. Helmut Maske Rubach

Miembro del comité



Dr. José Vinicio Macías Zamora

Miembro del comité



Dr. Facundo J. Márquez Rocha

Director de Estudios de Posgrado

Jefe del Depto. de Biotecnología Marina

27 de abril de 2001.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE
EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA



DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA MARINA

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CIANOBACTERIAS MARINAS
PRODUCTORAS DE COMPUESTOS DE INTERÉS BIOMÉDICO”.**

T E S I S

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para
obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

ALEJANDRA TORRES ARIÑO

Ensenada, Baja California, México, Abril de 2001.

RESUMEN de Tesis de ALEJANDRA TORRES ARIÑO presentada como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS con especialidad en BIOTECNOLOGIA MARINA. Ensenada, Baja California, México. Abril de 2001.

“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CIANOBACTERIAS MARINAS PRODUCTORAS DE COMPUESTOS DE INTERES BIOMEDICO”.

Resumen aprobado por:



Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Directora de Tesis

En el curso de la evolución, los microorganismos que habitan el ambiente marino se han adaptado excelentemente a condiciones extremas; tales como altas concentraciones de sal, temperaturas extremas tanto altas como bajas, alta presión y concentraciones bajas de nutrientes. Dichas condiciones extremas requieren de estrategias adaptativas únicas que conllevan la formación de productos naturales, con estructuras y características diferentes a las encontradas en organismos terrestres. Estos productos naturales marinos tienen un enorme potencial para diferentes aplicaciones biotecnológicas. En este trabajo se presentan las metodologías empleadas para el aislamiento, la caracterización morfológica y la estandarización de las técnicas moleculares de cepas de cianobacterias marinas de ambientes de costa halofílica, productoras de compuestos de interés biomédico. En este sentido se caracterizaron cianobacterias productoras de antibióticos y se evaluó la toxicidad de las mismas. Para la preparación de los extractos se utilizaron dos estrategias: los primeros se obtuvieron con la mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1) y los segundos, a partir de dicha mezcla se eluyeron en una columna de sílica gel con CH_2Cl_2 seguido de CH_3OH . A partir de esta última estrategia, se evaluaron 13 cepas de microorganismos tanto Gram (+) como Gram (-) y dos cepas de levadura. Con el aislamiento de géneros como *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Lyngbya* y *Spirulina*, se dio inicio a la colección de cianobacterias marinas del Departamento de Biotecnología Marina del CICESE. Sólo con la segunda estrategia de extracción se obtuvieron resultados de actividad antimicrobiana en *Pseudomonas aeruginosa* con fracciones de CH_3OH y en *Klebsiella pneumoniae* con fracciones de CH_3OH y CH_2Cl_2 . Varias de las fracciones en ambos disolventes fueron tóxicas para nauplios de *Artemia*. El empleo de oligonucleótidos específicos para cianobacterias permitió amplificar un fragmento de 2,100 pb correspondiente al gen que codifica para el ARNr 16S, la región intergénica (ITS) y el fragmento inicial del gen que codifica para el ARNr 23S. Además se diseñaron oligonucleótidos que permitirán, por un lado, la amplificación de dos regiones variables del gen que codifica para el ARNr 16S y por otro, la región ITS. Lo anterior permitirá corroborar la clasificación taxonómica, así como inferir en las relaciones filogénicas más cercanas entre cepas de cianobacterias.

Palabras clave: Cianobacterias marinas, antimicrobianos, toxicidad, potencial biomédico.

ABSTRACT of the Thesis of **ALEJANDRA TORRES ARIÑO**, presented as a partial requirement to obtain the **MASTER OF SCIENCE** degree with orientation in **MARINE BIOTECHNOLOGY**. Ensenada, Baja California, México. April 2001.

“ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MARINE CYANOBACTERIA WITH BIOMEDICAL INTEREST”.

Abstract approved by:



Ph. D. Elizabeth Ponce Rivas
Thesis Director

In the course of evolution, the microorganisms living in the marine environment have excellently adapted to the extreme marine environmental conditions; such as high salt concentration, extreme low or high temperature, high pressure (i.e. in thermal vents) and low nutrient concentrations. These extreme conditions require unique adaptation strategies leading to new natural products, which have different structures to those found in terrestrial organisms. These marine products have an enormous potential for different biotechnological applications. In the present work, I present the methodologies for isolation, morphological characterization and molecular techniques standarization of marine cyanobacterial strains. I focus on cyanobacterial from halophylic environments and with biomedical potential. Isolation of cyanobacteria strains belonging to the genera: *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Lyngbya* and *Spirulina*, I started the cyanobacterial collection at the Biotechnology Department of CICESE. In this sense, cyanobacterial characterization and toxicity evaluation were done. To obtain cianobacterial extracts two strategies were carried out; one with $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1). The second strategy consisted of an extraction with $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1) followed by an elution in silica gel columns with CH_2Cl_2 and CH_3OH . The extracts were tested to find antimicrobial activity using thirteenth strains of both Gram (+) and Gram (-), and two strains of yeast. Only in the case of the second strategy, *Pseudomonas aeruginosa* was susceptible to most of CH_3OH extracts. *Klebsiella pneumoniae* was sensible to both CH_2Cl_2 and CH_3OH extracts. Most of the cyanobacterial extracts were toxic against *Artemia nauplii*. Specific primers for cyanobacteria allowed the amplification of 2,100 bp DNA fragments which included the 16S rRNA gene as well as a part of the internal transcribed spacer (ITS) and the initial part of the 23S rRNA gene. Additional primers were designed to amplify two variable regions of the 16S rRNA gene and the ITS region. Using these fragments, it could be possible to confirm the taxonomic clasification to distinguish and establish relationships between genera and well-resolved species.

Key words: Marine cyanobacteria, antimicrobial activity, toxicity, biomedical potential.

A MI MADRE...

Sé de tus días de verano,
con sus días lluviosos.
Sé el lenguaje de las olas
del mar que te encanta.
Sé que el día que llegaste
fue el día en que te fuiste
y me duele acordarme.

De saber que estarías ahí,
hubiera caminado hasta cansar mis pasos.
No hubiera ocultado mis huellas,
hubiera dormido con los ojos abiertos
y de un sólo trago
me hubiera bebido el tiempo.

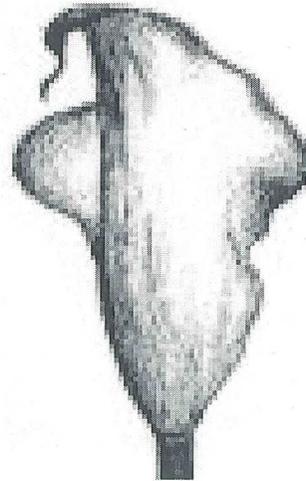
Cuando navegas en mis versos
sabes lo que estoy sintiendo.

Cuando te alejas de un lugar
es porque estás cerca de otro.

Cuando se va tu pensamiento
es porque está muy junto al mío.

Sé que por tí, te quedarías conmigo.
Sé que no prometiste.

Sé que no me dejaste,
que tan sólo seguías tu camino.



A mi padre.. *Rodolfo Torres R.*

mis hermanos.. *Nané y Ro*

Mi sobrina.. *Pame*

y el *retoño.*

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), al Depto. de Biotecnología Marina por todas las facilidades brindadas en el desarrollo de este trabajo y en especial al personal del Depto. de Acuicultura por sus facilidades, consejos, comentarios y apoyo incondicional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca crédito otorgada para la realización de este trabajo con Nú. de registro 127724

A la Compañía Exportadora de Sal, S.A. (ESSA), especialmente a: Lic. Raúl Lyle T., Lic. Juan A. Flores y Biól. Sonia F. Jiménez, por el acceso y las facilidades brindadas para la toma de muestras.

A la Empresa BGB Acuicultura, especialmente a la M. en C. Gabriela Velazco, por su calidez y por brindarnos las muestras de mejillón.

A la Comisión Federal de Electricidad, Residencia General de Cerro Prieto; al Ing. José F. Arellano por permitirnos el acceso a la empresa y por su hospitalidad. Un especial agradecimiento al M. en C. Rogelio Vázquez G., por sus atenciones proporcionadas antes, durante y después de la salida.

A mi Director de tesis, Dra. Elizabeth Ponce Rivas, por sus comentarios para mejorar la calidad de este trabajo.

A mis sinodales: Dr. Helmut Maske Rubach por su especial atención y comentarios atinados; Dr. J. de Jesús Paniagua Michel por sus acertadas sugerencias e incondicional apoyo; al Dr. Vinicio Macías Zamora por su interés en el tema. Especialmente agradezco a M. en C. Graciela Guerra Rivas, mi maestra y amiga, quien supo guiarme de una manera excepcional.

Al Dr. Alejandro López-Cortés y la Dra. Bertha Olivia Arredondo (CIBNOR) por proporcionarnos las cepas de cianobacterias utilizadas en la estandarización de las técnicas moleculares.

Un especial y profundo agradecimiento a la Dra. Beatriz Cordero y la Dra. Pilar Sánchez. Primero, por permitirme saquear de material sus laboratorios; Segundo y el más importante, por su amistad, cariño, consejos y palabras de aliento en los momentos de desconcierto.

Al Dr. William Fenical por sus consejos y especialmente a la Téc. Sara Kelly del Center for Marine Biotechnology and Biomedicine (Scripps Institution of Oceanography, UCSD) por asistirme durante mi estancia.

A Ivonne Best, amiga que en todo momento estuvo dispuesta a ayudarme.

Al Biól. Norberto Flores por su amistad y el gran apoyo técnico brindado en el montaje de los sistemas de cultivo.

A la Dra Pilar Sánchez (CICESE), M. en C. Sergio Curiel (CICESE), Dr. Francisco Correa (IIO-UABC) y a la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UABC) por su donación desinteresada de los quistes de *Artemia*. Sincero agradecimiento al Ocean. Eduardo Talamás R. por todo el apoyo y las instalaciones brindadas para la eclosión de los quistes de *Artemia*.

A la Dra. Elizabeth Orellana C. por creer en mi e integrarme al proyecto de Aislamiento de Fitoplancton Marino, por toda su amistad y disposición de ayudarme en todo momento. Asimismo por invitarme a colaborar con la empresa Sol Azul, S.A. de C.V. y con el Programa CIMO, su apoyo económico fue de vital ayuda para finalizar este trabajo.

Al M.en C. Jorge A. Simental Trinidad por su disposición en la toma de algunas de las fotografías que aparecen en esta tesis.

A mis amigos y compañeros: Asunción, Mauricio, César, Silvia, Flore, Yessi, Raque, Galdy y Daniel por compartir todo el trajín de la maestría y ... las pachangas. Asimismo, Copa, Efrén, Yanet, Gissel, Carmen, Paty, Campa, Billy, Gissela, Sergio, Lore, Leonel, Xochitl, Cecy, Carlo, Mario, Rossy, Alex, Karel y Rebe .. y si alguien me faltó...disculpen.

A tí, Alexa, por el cariño, apoyo y la amistad que siempre me brindaste.

A toda la familia Banda Bermúdez por hacerme sentir parte de su familia. Igualmente a la familia Mynes por estar siempre al pendiente.

Un profundo agradecimiento a Alejandrina Cervantes, Bibiana Medina, Cecilia Loera y Ma. Elena Corona por siempre estar en la disposición de resolver cualquier contratiempo y por supuesto que por su amistad.

A mis amigos: Dr. Jorge Cáceres y Dr. Fernando Bückle por su apoyo incondicional. A ti, Miguel A. del Río por tu amistad, apoyo y constantes consejos brindados.

A Lupita por su amistad y el cafecito mañanero y A Don Rafa por siempre aguantar los desvelos y estar siempre atento a las necesidades. A Don Gil por su recibimiento siempre alegre.

A mi amiga Paty Vázquez por permitirme usar y modificar su poema Nostalgia de la dedicatoria.

A Tere, Ana Luisa, Rocío, Ivanna, Millery y la nueva Astery, por su sonrisa siempre alegre, cariño y bondad. Las Quiero Mucho.

Y.. no podían faltar... BUSSY y BECA.

Por último, mi agradecimiento eterno para mi *MADRE* quien siempre fue y será un ejemplo para mí; mi *PADRE* quien con su apoyo me ha sabido guiar; mi *HERMANA*, *PAME* y *CUÑADO* quienes me impulsan constantemente y mi *HERMANO*, niño inquieto, quien me anima a seguir. Los *AMO*.

GRACIAS.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Taxonomía de las cianobacterias	5
I.2 Fármacos antimicrobianos: consideraciones generales	6
II. ANTECEDENTES	7
II.1 Productos antimicrobianos como agentes terapéuticos	11
III. JUSTIFICACIÓN	13
IV. OBJETIVOS	14
IV.1 General	14
IV.2 Particulares	14
V. MATERIALES Y MÉTODOS	15
V.1 Colecta de cianobacterias	15
V.1.1 Bahía de Concepción, B.C.S., México	15
V.1.2 ESSA, Gro. Negro, B.C.S., México	16
V.1.3 BGB Acuacultura, Ensenada, B.C., México	16
V.1.4 Brazo de San Quintín, B.C., México	16
V.1.5 Campo Geotérmico, Cerro Prieto, B.C., México	17
V.2 Procedimiento de muestreo	18
V.3 Transporte de las muestras	18
V.4 Medición de variables fisicoquímicos	18
V.5 Selección del medio de cultivo	18
V.5.1 Elaboración del medio de cultivo líquido	19
V.5.2 Elaboración del medio de cultivo sólido	20
V.6 Obtención de cianobacterias	20
V.7 Técnicas de aislamiento de cianobacterias	22
V.7.1 Técnica de dilución seriada	22
V.7.2 Técnica de vaciado en placa	22
V.7.3 Técnica de transferencia por bloque invertido	22
V.7.4 Aislamiento por deslizamiento y fototactismo	22
V.7.5 Aislamiento por medios mecánicos	23
V.8 Obtención de extractos	23
V.9 Pruebas de antibiosis	24
V.9.1 Método de difusión en placa	26
V.9.2 Método de dilución	27
V.10 Prueba de toxicidad	27
V.11 Clasificación de cianobacterias	29
V.11.1 Taxonómica	29
V.11.2 Métodos moleculares	29
V.11.2.1 Análisis de restricción teórico	31
V.11.2.2 Análisis de restricción experimental	31
V.12 Mantenimiento de los cultivos	31
V.13 Clasificación taxonómica	29
V.13.1 Estandarización de métodos moleculares	29
V.14 Análisis de restricción teórico	30
V.15 Análisis de restricción experimental	31
V.16 Mantenimiento de los cultivos	31
VI. RESULTADOS	32

CONTENIDO (Continuación...)

VI.1 Estructura de los Tapetes microbianos	32
VI.2 Aislamiento	36
VI.2.1 Eliminación de contaminantes biológicos	37
VI.3 Obtención de extractos de cianobacterias	38
VI.4 Actividad antimicrobiana	39
VI.5 Bioensayo de toxicidad en <i>Artemia</i> .	41
VI.6 Análisis taxonómico	45
VI.6.1 Colección de cianobacterias marinas	45
VI.6.1.1 Mantenimiento de los cultivos	53
VI.7 Análisis molecular	56
VI.7.1 Estandarización de los métodos moleculares	56
VI.7.2 Análisis de restricción teórico	58
VI.7.3 Análisis de restricción experimental	59
VII. DISCUSIONES	61
VII.1 Aislamiento y eliminación de contaminantes biológicos	61
VII.2 Actividad antimicrobiana	64
VII.3 Toxicidad de los extractos de cianobacterias	65
VII.4 Caracterización de las cianobacterias	68
VII.5 Análisis molecular	69
VII.5.1 Extracción de ADN cromosomal	69
VII.6 Mantenimiento de los cultivos	71
VIII. CONCLUSIONES	72
LITERATURA CITADA	74
ANEXOS	85

LISTA DE FIGURAS

Figura		Páginas
1	Corte de tapete microbiano mostrando organización laminar. Guerrero Negro, B.C.S., México. Foto: López-Cortés, A.	3
2	Distribución mundial de algunas localidades poseedoras de tapetes microbianos y de sus análogos. Modificado de Awramik y Cloud (1978).	4
3	Localización de las zonas de estudio en La Península de Baja California, México.	15
4	Técnica de dilución seriada utilizada en el aislamiento de cianobacterias.	21
5	Técnica de difusión en agar (Método de Kirby-Bauer).	26
6	Técnica de dilución para la obtención de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).	27
7	Estadio de nauplio II de <i>Artemia</i> utilizado en las pruebas de toxicidad.	28
8	Filamentos de cianobacterias marinas de aberturas termales de Bahía Concepción, B.C.S., México. Foto: López-Cortés, A.	32
9	Tapete microbiano (→) característico de los vasos concentradores de sal de Guerrero Negro, B.C.S., México. Foto: Simental-Trinidad, J.	33
10	Polígonos de desecación del Brazo de San Quintín, B.C. México. Foto: Torres-Ariño, A.	33
11	Natas superficiales compuestas de cianobacterias y bacterias heterótrofas del Campo Geotérmico, Mexicali, B.C., México. Foto: Torres-Ariño, A.	34
12	Mejillones (<i>M. galloprovincialis</i>) colectados del estanque de reproductores de la empresa BGB Acuacultura. Foto: Anónimo.	35
13	Cianobacterias marinas de los termales de Santispac, Bahía Concepción, B.C.S., México. Fotos: López-Cortés, A. y Torres-Ariño, A.	48

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
14	Cianobacterias de los vasos concentradores de sal de la Compañía Exportadora de Sal (ESSA). Gro. Negro, B.C.S., México. Foto: Torres-Ariño, A.	50
15	Cianobacterias del estanque de reproductores de <i>M. galloprovincialis</i> de la empresa BGB Acuicultura. Punta Banda, B.C., México. Foto: Torres-Ariño, A.	51
16	Cianobacterias de agua dulce, utilizadas en la estandarización de las técnicas moleculares y para la selección de la técnica de preservación. Foto: Torres-Ariño, A.	52
17	Cianobacterias de polígonos de desecación del Brazo de San Quintín, B.C., México. Foto: Torres-Ariño, A.	53
18	Cianobacterias marinas utilizadas en la estandarización de las técnicas moleculares. Foto: López-Cortés, A.	55
19	Oligonucleótidos utilizados en la caracterización de cianobacterias.	56
20	Fragmentos de ADN en gel de agarosa al 1.2%, obtenidos por PCR directamente de cultivos.	57
21	Adn cromosomal de cianobacterias marinas.	57
22	Amplificación del ADN ribosomal en gel de agarosa al 1.2%, obtenida por PCR previa extracción del ADN cromosomal.	58
23	Ejemplo del análisis de restricción teórico con el gen que codifica para el ARNr 16S de <i>Spirulina subsalsa</i> .	58
24	Patrón de bandeo de la cepa 17bSQ utilizada para la estandarización del análisis de restricción experimental.	59
25	Fragmentos obtenidos de la digestión de productos de PCR	60

LISTA DE TABLAS

I	Microorganismos utilizados para determinar la actividad inhibitoria de los extractos.	25
II	Técnicas utilizadas para el aislamiento y eliminación de contaminantes biológicos.	36
III	Relación de extractos de cianobacterias utilizadas en este estudio.	38
IV	Antibióticos utilizados para la selección del control positivo en los ensayos de actividad antimicrobiana en cianobacterias.	40
V	Actividad antimicrobiana de los extractos de cianobacterias marinas.	40
VI	Mortalidad (%) de <i>Artemia</i> expuesta a fracciones de CH ₂ Cl ₂ resuspendidas en agua de mar.	42
VII	Mortalidad (%) de <i>Artemia</i> expuesta a fracciones de CH ₃ OH .	43
VIII	Características de las cianobacterias que forman la colección del Laboratorio de Microbiología Molecular.	45
IX	Características particulares de las cepas de cianobacterias, utilizadas para la estandarización de las técnicas moleculares.	53

“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CIANOBACTERIAS MARINAS PRODUCTORAS DE COMPUESTOS DE INTERÉS BIOMÉDICO”.

I. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos marinos han tenido un profundo efecto en la ciencia médica desde que se descubrió que unos eran los causantes de un sin fin de patologías y que otros, a su vez producían sustancias orgánicas para contrarrestar dichas afecciones.

Como resultado de las investigaciones en este campo, se ha podido encontrar que los microorganismos marinos (bacterias, hongos y microalgas) han desarrollado capacidades fisiológicas particulares para asegurar su sobrevivencia en ambientes extremos, como la producción de metabolitos, productos de rutas biosintéticas únicas y diferentes a las conocidas para los metabolitos de origen terrestre (Fenical, 1993; Schimizu, 1993; Fenical, 1997). El origen de los productos naturales marinos, aunado a sus estructuras y perfiles biológicos, han sido características relevantes para el desarrollo de compuestos secundarios con usos biomédicos o agroquímicos. El conocimiento de su biosíntesis puede ayudar a la identificación de intermediarios traza, los cuales pueden tener un perfil terapéutico particular o proveer información acerca de la optimización de la producción de metabolitos. Los productos naturales marinos de interés biomédico aislados hasta ahora, son muy difíciles de reproducir mediante síntesis orgánica y la modificación sintética de los compuestos para proveer de análogos semisintéticos requieren de contar con grandes cantidades de los compuestos precursores puros.

Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos que no son utilizados por el organismo para su metabolismo primario, incluyen compuestos que actúan como, antibióticos, aleloquímicos y toxinas, entre otros.

Entre los microorganismos con gran potencial para la producción de sustancias bioactivas con nuevas propiedades se encuentran las cianobacterias. Estas comprenden un grupo muy diverso y grande de procariotas fotosintéticos clasificados como bacterias Gram (-) con base a su ultraestructura (Stanier y Cohen-Brazire, 1977), pero que a su vez comparten con las algas eucariotas y las plantas superiores, la capacidad de llevar a cabo fotosíntesis oxigénica, por lo que se incluyen dentro de la categoría de las algas. En general son fotoautótrofas obligadas y algunas especies presentan crecimiento heterotrófico facultativo (Rippka *et al.*, 1979). Un rasgo metabólico importante de algunas especies, es la presencia de la enzima nitrogenasa, la cual les confiere la característica de fijar nitrógeno atmosférico (Bothe, 1982).

Las cianobacterias, junto con las microalgas marinas, comprenden la mayoría de las especies encontradas en los océanos del mundo, de las cuales no existe una estimación definitiva del número total de especies ya que otras especies están siendo descubiertas constantemente y el número va en aumento. Las cianobacterias han sido estudiadas primeramente por su morfología como organismos procariotas, su mecanismo de fotosíntesis, proceso de fijación de nitrógeno (Patterson, 1996), aspectos de su estructura, como complementos alimenticios y recientemente por la producción de una amplia variedad de metabolitos secundarios únicos (Carmichael, 1992) y de gran interés que han comenzado a aislarse. Su diversidad química sólo es comparable a los metabolitos del orden de los Actinomicetos. Sin embargo, la mayoría de las cianobacterias investigadas son de agua dulce o de ambientes terrestres, y sólo un número limitado de cianobacterias marinas han sido investigadas para la búsqueda de metabolitos secundarios. No obstante,

hay un gran número de indicios del papel importante de las cianobacterias en la producción de compuestos de interés biomédico e industrial (Shimizu, 1993; Patterson, 1996).

Por lo anterior, se considera que las cianobacterias han mostrado ser una fuente de innovación biotecnológica, y es común encontrarlas formando consorcios denominados tapetes microbianos (Bender *et al.*, 1994). Dichos consorcios son comunidades laminadas y su desarrollo depende del tamaño del grano del sedimento, la tasa de erosión, penetración de luz, tasa de sedimentación, capilaridad y del pastoreo. Estos tapetes microbianos compuestos principalmente por cianobacterias se desarrollan en reservorios de agua someros e hipersalinos y su laminación (Figura 1) se da como resultado a las variaciones estacionales en la intensidad de luz, temperatura, salinidad y disponibilidad de nutrientes (Pentecost, 1984; Jorgensen, 1989). Dichos factores influyen la composición y abundancia relativa de la composición de especies y pigmentos (López-Cortés y Tovar, 1992), dando diferencias en el color superficial de los tapetes (López-Cortés, 1990). Estos sistemas son estables y las comunidades resaltan por su autoorganización en biopelículas estratificadas que se organizan para su máxima eficiencia (Bender *et al.*, 1994).

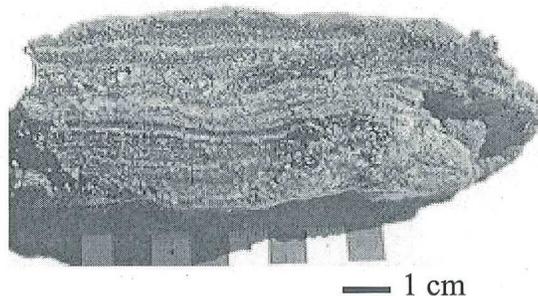


Figura 1. Corte de tapete microbiano mostrando organización laminar. Guerrero Negro, B.C.S., México. Foto: López-Cortés, A.

Los tapetes microbianos están distribuidos a lo largo del planeta, donde las condiciones de salinidad, desecación y temperatura son extremas, ocasionando la exclusión de la mayoría de los organismos eucariontes (Awramik y Cloud, 1978; Golubic, 1976; Margulis *et al.*, 1983) (Figura 2). Estos tapetes comenzaron a estudiarse por el hecho de poder a las contrapartes modernas de los fósiles más antiguos del planeta (Margulis *et al.*,

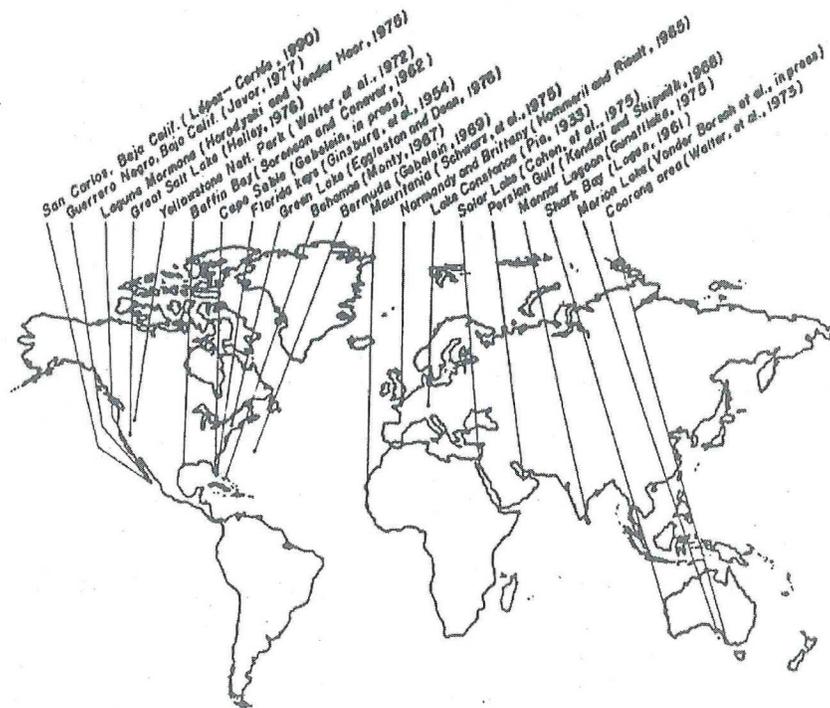


Figura 2. Distribución mundial de algunas localidades poseedoras de tapetes microbianos y de sus análogos. Modificado de Awramik y Cloud (1978).

1983; López-Cortés, 1990), proporcionando información útil para reconstruir las primeras etapas de la evolución de la vida a través de la interpretación de sus contrapartes fósiles, estromatolitos, incluidos en rocas precámbricas de 600 a 3500 millones de años (López-Cortés *et al.*, 1984). El establecimiento de los tapetes microbianos en estanques de evaporación de agua de mar radica en que éstos tienen influencia en la producción de la

calidad de sal blanca (Jones *et al.*, 1981; Schneider y Hermann, 1980). Otros de sus aprovechamientos son en la industria química, farmacéutica y de los alimentos por los pigmentos de fotótrofos, clorofilas, carotenoides y ficobiliproteínas que se han extraído principalmente de las microalgas y de algunas cianobacterias (Richmond, 1986). Son evidentes las capacidades potenciales de las cianobacterias para producir bienes y servicios como: la fijación aeróbica de nitrógeno por *Oscillatoria* y *Microcoleus* (Cohen y Rosenberg, 1989); fotoproducción de hidrógeno y producción de biomasa por *Synechococcus* (Mitsui, 1979); fuente de proteínas y vitaminas por *Spirulina* (Rodríguez-López, 1983); producción de precursores vitamínicos y agentes anticancerígenos por diversas cianobacterias (Beardsley, 1991); la utilización de las ficobiliproteínas como inmunotrazadores (Curtin, 1985) y la producción de pigmentos como agentes colorantes naturales y desodorantes (Rodríguez-López, 1983).

I.1 Taxonomía de las cianobacterias.

La taxonomía de las cianobacterias es una disciplina altamente dinámica y compleja (Anagnostidis y Komárek, 1985) razón por la cual, los nombres específicos de las cepas varían entre los autores, dependiendo de las condiciones a las que fueron aisladas y cultivadas (Hoffman, 1988). Dentro de éstos, el sistema de clasificación de la escuela Geitleriana (Geitler, 1925; Desikachary, 1959; Anagnostidis y Komárek, 1988) es el más completo. Las herramientas de biología molecular han permitido clasificar a las cianobacterias a nivel de especie e inferir en las relaciones filogenéticas más cercanas entre cepas de cianobacterias (Wilmotte *et al.*, 1992).

I.2 Fármacos antimicrobianos: consideraciones generales.

Se han identificado cientos de antibióticos y muchos han sido llevados a la etapa en que tienen utilidad en la terapéutica de enfermedades infecciosas. Los antibióticos muestran diferencias notables en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en sus espectros antibacterianos y en sus mecanismos de acción. Por tal motivo, la clasificación más común se ha basado en la estructura química y los mecanismos de acción, así se consideran: 1) Compuestos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana o acción antimicrobiana a través de la inhibición de la síntesis de la pared celular (cefalosporinas, penicilinas, vancomicina y los antimicóticos del tipo de imidazol como miconazol y clotrimazol); 2) Alteración de la permeabilidad de la membrana celular o inhibición del transporte activo a través de la membrana (detergentes como polimixina y antimicóticos poliénicos como nistatina); 3) Inhibición de la síntesis proteica, afectando las subunidades ribosómicas 30 S y 50 S (cloramfenicol, tetraciclinas, eritromicina) y aquellos compuestos (aminoglucósidos) que se unen a la subunidad ribosómica 30 S y que también alteran la síntesis proteica, lo cual culmina en la muerte del microorganismo (Jawetz *et al.*, 1987; Hardman *et al.*, 1997).

II. ANTECEDENTES

Los programas de bioprospección en cianobacterias comenzaron en 1970 con estudios acerca de su toxicidad, pero debido a las dificultades de colecta y a la no reproducibilidad de las muestras en laboratorio, los esfuerzos en este campo se vieron truncados y por tal motivo han recibido muy poca atención (Patterson *et al.*, 1991). No fue sino hasta 1980, que los programas biofarmacéuticos para tratamientos de enfermedades como el cáncer y el SIDA, identificaron a las cianobacterias como uno de los grupos más prominentes de microorganismos capaces de producir nuevos productos potencialmente bioactivos. Algunos de estos productos naturales marinos aislados, no sólo se consideran como fármacos potenciales sino que también son requeridos en estudios básicos en áreas como la bioquímica, farmacología y fisiología. Un número limitado de investigadores han examinado a las cianobacterias para la producción de enzimas inhibidoras (Cannell *et al.*, 1988; Schwartz *et al.*, 1990), antibióticos (Mason *et al.*, 1982; Flores y Wolk, 1986) y como agentes anticancerígenos (Reinhart *et al.*, 1981; Gerwick *et al.*, 1989). Cada uno de estos cribados han establecido que las cianobacterias son una fuente de agentes bioactivos novedosos. La industria farmacéutica ha mostrado poco interés en las cianobacterias, reflejando en parte el grado de diferencia de las mismas con las fuentes de microorganismos tradicionales. Sin embargo, los avances en las técnicas de ingeniería genética de las cianobacterias (Ciferri *et al.*, 1989) han reducido los problemas de manejo de las mismas, generando más interés en el estudio de dichos microorganismos. Los productos naturales de cianobacterias han sido clasificados dentro de las clases estructurales siguientes: acetogeninas, bromofenoles, ácidos grasos, terpenos y esteroides, alcaloides (indoles, purinas y compuestos tipo tropanos), amidas, oligosacáridos cíclicos,

macrólidos y péptidos cíclicos. Los usos potenciales de la actividad biológica para estos compuestos incluyen: antibióticos, antimicóticos, actividad antitumoral, citotoxicidad a células de cáncer, antiinflamatorios y también toxicidad neuromuscular. Más recientemente, el reconocimiento de las cianobacterias como recursos promisorios de productos naturales anticancerígenos ha guiado la iniciación de programas de cribado por el U.S. National Cancer Institute, entre otras instituciones. No obstante los resultados alentadores obtenidos de trabajos con especies marinas del Pacífico y varias especies de cianobacterias de agua dulce, se han conducido relativamente pocas investigaciones con estos procariotas de ubicación amplia (Gerwick *et al.*, 1989).

Las toxinas producidas por cianobacterias han sido agrupadas en dos categorías principales en base al tipo de bioensayo utilizado en la búsqueda de su actividad: las citotoxinas, llamadas así por ser detectadas en líneas celulares de mamíferos (especialmente en líneas de células tumorales) y las biotoxinas que reciben su nombre porque utilizan pequeños animales para su detección (Carmichael, 1992). Aún se desconoce el por qué las cianobacterias producen dichas toxinas, pero probablemente funcionen como compuestos de protección (Carmichael, 1986; DeMott *et al.*, 1991).

La mayoría de las investigaciones de los productos naturales de cianobacterias se han realizado con especies de agua dulce. Dentro de los géneros tóxicos, los más representativos son *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nodularia* y *Oscillatoria*. Varias toxinas han sido aisladas de cianobacterias, purificadas, identificadas y utilizadas en estudios bioquímicos y farmacológicos con mamíferos, tejidos aislados y cultivos celulares (Carmichael *et al.*, 1990). Las toxinas mejor estudiadas son las microcistinas producidas por los géneros *Microcystis* y *Oscillatoria*. Los estudios con *M. aeruginosa* mostraron que

la producción de la toxina microcistina LR difiere mucho entre cepas (Watanabe *et al.*, 1988) y es influenciada por las condiciones de cultivo (Watanabe y Oishi, 1985). Más recientemente compuestos citotóxicos con actividad antialgal, antifúngica, antibacteriana, antiprotozoa y antineoplástica han sido encontrados en los géneros *Scytonema*, *Oscillatoria*, *Hapalosiphon* y *Plectonema* (Carmichael *et al.*, 1990; Patterson *et al.*, 1991). Algunos alcaloides neurotóxicos (anatoxinas) son producidos por *Anabaena*, *Aphanizomenon* y *Oscillatoria*; mientras que las toxinas PSP causantes de la parálisis en algunas especies de invertebrados marinos y dulceacuícolas son producidos por *Anabaena*, *Aphanizomenon* y *Lyngbya*. Los péptidos hepatotóxicos (microcistinas y nodularinas) se han encontrado en *Anabaena*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc* y *Oscillatoria*. Los géneros *Cilindrospermopsis* y *Umezakia* son responsables de la producción de un potente alcaloide hepatotóxico conocido como cilindrospermopsina y algunos géneros, especialmente *Anabaena*, pueden producir tanto neurotoxinas como hepatotoxinas (Carmichael, 1995). Trabajos recientes mencionan el aislamiento de una nueva nodularina (L-Val²) conocida como motuporina (Reinhart *et al.*, 1994) y de dos péptidos cíclicos (anabaenopeptinas y anabaenopeptílicos) aislados a partir de tres cepas de *Anabaena* que también producen microcistinas (Fujii *et al.*, 1996). En la búsqueda de nuevos inhibidores de proteasas (Shin *et al.*, 1997) se han aislado dos nuevas anabaenopeptinas (E y F) de las cianobacteria de agua dulce *Oscillatoria agardhii* y dos inhibidores de elastasas designados como nostopeptinas A y B (Okino *et al.*, 1997) de la cianobacteria de agua dulce *Nostoc minutum*. Además existen trabajos de inhibidores de plasminógeno como las micropeptinas, aisladas de la cianobacteria de agua dulce *Microcystis aeruginosa* (Ishida *et al.*, 1997).

Para el caso de las cianobacterias marinas, el envenenamiento por contacto ha sido observado en los géneros como *Lyngbya*, *Oscillatoria* y *Schizothrix*. Algunos de los compuestos más importantes se han aislado de la cianobacteria marina *Lyngbya majuscula* (Koehn *et al.*, 1992; Carté, 1996). Cardellina *et al.* (1979) encontraron que los metabolitos lyngbyatoxina A y debroaplysioatoxina de esta cianobacteria son altamente inflamatorios; por su parte Koehn *et al.* (1992) aislaron dos péptidos inmunosupresores, las microcolinas A y B. Posteriormente el agente antiproliferativo (curacina A) fue aislado por Gerwick *et al.* (1994). Un nuevo compuesto citotóxico (Simplostatina 1 de la cianobacteria marina *Symploca hydroides*) análogo del dolstatina 10, el cual se encuentra en fase I como un agente anticancerígeno (Harrigan *et al.*, 1998).

Otras investigaciones se han enfocado al estudio de las rutas biosintéticas (Garson, 1993; Reinhart *et al.*, 1994) de compuestos de cianobacterias promotores de la actividad tumoral, particularmente de las microcistinas y nodularinas (Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1991; Fujiki *et al.*, 1991). Sin embargo, la motuporina muestra citotoxicidad contra líneas celulares tumorales (deSilva *et al.*, 1992).

Los ecosistemas hipersalinos en la Península de Baja California están bien representados, en donde habitan arqueobacterias halofílicas y comunidades bentónicas microbianas o tapetes microbianos (Figura 1 y 2). La Península de Baja California se caracteriza por la existencia de al menos cuatro sitios (Laguna Figueroa, Guerrero Negro, San Carlos y Bahía de Concepción) con presencia de tapetes microbianos laminados que son comunes en las superficies de agua somera, en sus planicies evaporíticas, canales de marea, lagunas naturales y manantiales termales, representados principalmente por cianobacterias. Javor y Castenholz (1981) han descrito a la Laguna Ojo de Liebre en B.C.S.

como un sitio de formación de tapetes; Stolz (1983) describe la formación de estos sistemas en la Laguna Figueroa, B.C. Los tapetes microbianos de Guerrero Negro, B.C.S., se consideran los mejor estudiados (Javor y Castenholz, 1984) en su estructura, diversidad microbiana y fijación de nitrógeno. Los tapetes de San Carlos, B.C.S., se han estudiado por sus cambios en la población y el papel del NaCl en la producción de β -caroteno en *Microcoleus* (López-Cortés y Tovar, 1992).

Dichas comunidades microbianas juegan un papel importante en la producción acuática y dinámica de nutrimentos de ambientes acuáticos, como en estanques de acuacultura y en la producción de sal. Los estudios realizados a la fecha en los ambientes hipersalinos de Baja California se han enfocado a estudiar la participación de las Halobacterias en la formación de cristales de sal (López-Cortés *et al.*, 1994).

La Península de Baja California cuenta con una amplia extensión de agua y diversos ambientes marinos, incluyendo regiones con condiciones extremas de salinidad, en donde diferentes especies de cianobacterias pueden ser colectadas y evaluadas. Debido a esto el presente trabajo pretende explorar el potencial de las cianobacterias en la producción de compuestos de interés biomédico. Por lo anterior, este proyecto representa la iniciación de esfuerzos en el estudio de la biodiversidad regional de cianobacterias.

II.1 Productos antimicrobianos como agentes terapéuticos.

Aunque desde el siglo XVIII se habían empleado varias sustancias químicas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, la quimioterapia antimicrobiana principia con Paul Ehrlich (Jawetz *et al.*, 1987), quien formuló los principios de la toxicidad selectiva y reconoció las relaciones químicas específicas entre los parásitos y los medicamentos, así

como el desarrollo de la resistencia por éstos a los medicamentos. Pasteur y Joubert (1877), fueron también algunos de los primeros investigadores en reconocer el potencial clínico de productos microbianos como agentes terapéuticos, como el hecho de que existían mecanismos “antibióticos” entre las especies inferiores, incluso en mayor grado que entre animales y plantas más evolucionados, con lo que se demostró que existían sustancias antimicrobianas en cultivos bacterianos.

La época actual de la quimioterapia antimicrobiana comenzó con el empleo de la sulfonilamida en seres humanos en 1936. No obstante, la “época de oro” de los antibióticos comenzó con la producción de penicilina en 1941. Cuando menos el 30 % de los pacientes hospitalizados en la actualidad recibe uno o más ciclos de antibioticoterapia, y los compuestos han curado millones de infecciones que pudieron haber sido letales. Sin embargo, al mismo tiempo, dichos compuestos son utilizados de manera errónea por los médicos e incluso han sido objeto de abuso por la automedicación (Jaramillo, 1996). Una consecuencia del uso inapropiado ha sido la aparición de microorganismos patógenos resistentes a dichos agentes, y ésto a su vez ha sido el punto de partida de la necesidad - cada vez mayor - de contar con nuevos fármacos (Chambers y Sande, 1997).

III. JUSTIFICACION

Los microorganismos marinos han sido reconocidos tanto en la industria como en la academia como una fuente potencial de compuestos de interés biomédico; debido a la producción de metabolitos secundarios con propiedades únicas, que se han aislado de ellos.

Diversos programas enfocados en la búsqueda de compuestos bioactivos, como el llevado a cabo por el U.S. National Cancer Institute, han identificado a las cianobacterias como uno de los grupos más promisorios para el descubrimiento de productos naturales de interés biomédico. Por tal motivo, las cianobacterias han mostrado ser una fuente de innovación biotecnológica y varios de sus metabolitos presentan estructuras únicas que son producto de rutas biosintéticas poco diferentes a aquéllas conocidas para los metabolitos terrestres. Sin embargo, la mayoría de las cianobacterias estudiadas son de agua dulce o de ambientes terrestres y muy pocas de ambientes marinos; por lo que en dicho trabajo se espera encontrar compuestos con actividad biológica novedosa.

A pesar de que los programas de escrutinio se han iniciado en varias partes del mundo, la región del Pacífico mexicano continúa sin explorarse; siendo que la Península de Baja California posee los ambientes hipersalinos propicios para las cianobacterias y para una gran diversidad de microorganismos de importancia científica y económica.

Este proyecto provee una primera oportunidad de generar una explotación sistemática de estos recursos biológicos importantes; además de que nuevas regiones del Océano Pacífico, especialmente las regiones del Noroeste de México, serán exploradas. También contribuirá al estudio de la biodiversidad de las cianobacterias de la región.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General:

Contribuir al estudio de la biodiversidad de cianobacterias regionales por medio del aislamiento y caracterización de cianobacterias productoras de compuestos de interés biomédico, con enfoque especial en las especies de costas halofílicas de la Península de Baja California, México.

IV.2 Particulares:

1. Aislamiento de cianobacterias marinas de diferentes lugares de la Península de Baja California, México.
2. Determinación de la actividad antimicrobiana y toxicidad de fracciones crudas obtenidas de las cianobacterias aisladas.
3. Caracterización taxonómica y molecular de las cianobacterias aisladas.
4. Iniciación de una colección de cianobacterias regionales para el Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Biotecnología Marina del CICESE.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Colecta de cianobacterias. La colección de cianobacterias se realizó en diversos lugares de la Península de Baja California, como son (Figura 3):

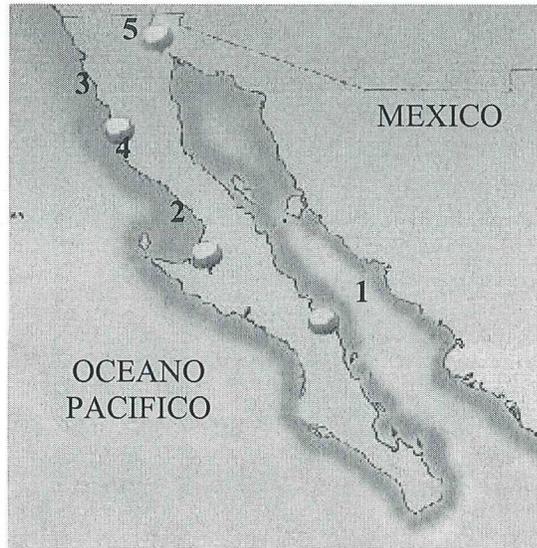


Figura 3. Localización de las zonas de estudio en la Península de Baja California, México. 1) Bahía de Concepción, B.C.S.; 2) ESSA, Guerrero Negro, B.C.S. ; 3) BGB Acuacultura, Ensenada, B.C.; 4) Brazo de San Quintín, Bahía de San Quintín, B.C. y 5) C.F.E., Campo Geotérmico, Cerro Prieto, B.C.

V.I.1 Bahía de Concepción, B.C.S., México. Bahía natural al sur de Mulegé la cual posee regiones salinas y condiciones de temperatura extremas, en su región hacia el sur. Los manantiales termales de donde emana agua dulce caliente, se localizan a 14 km al sur de Mulegé en la latitud $26^{\circ}45'46''$ y longitud $111^{\circ}53'38''$.

Colecta: El trabajo de campo se realizó del 27 al 30 de agosto de 1999. Se seleccionaron tres sitios de muestreo del lado oeste de la bahía: (a) Manantiales termales del sistema de costa evaporítica de la Playa Santispac. En la localidad se ubicaron 2 manantiales termales en una planicie evaporítica, limitados del mar por ecosistemas de manglar, una pequeña

laguna y playa; (b) Material del fondo (50 cm a 2.0 m) de la Laguna consistente de algas calcáreas, arena, rocas y material fangoso.

V.I.2 Compañía Exportadora de Sal, S.A. de C.V. (ESSA), Guerrero Negro, B.C.S.,

México. La empresa cuenta con un total de 19,627 Ha., donde casi 16,000 Ha. corresponden a los vasos concentradores y 2,465 Ha. a charcas de cristalización.

Colecta: La colecta de muestras se realizó el 30 de agosto de 1999. Las muestras se tomaron de los fondos de los vasos concentradores 4, 5, 6 y de la Ciénega de la Laguna Ojo de Liebre.

V.I.3 Empresa BGB Acuicultura, Rincón de Ballenas, Ensenada, B.C., México. El

cultivo de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) se encuentra en la parte Sur de la Bahía de Todos Santos y comprende un área de 94 Ha. La Bahía de Todos Santos se encuentra en el extremo Noroeste de la Península de Baja California entre los paralelos 31°40' y 31°50' de latitud Norte, 116°36' y 116°50" de longitud Oeste, ocupando un área aproximada de 180 km². Limita al Sur con la Península de Punta Banda y al oeste con las Islas Todos Santos. Al Norte limita con Punta San Miguel y al Sureste con el Estero Punta Banda.

Colecta: La toma de muestras se realizó el 23 de septiembre de 1999. Se colectaron muestras de agua y de organismos de los estanques de reproductores de mejillón.

V.I.4 Brazo de San Quintín, Bahía de San Quintín, B.C., México. Lugar donde se

encuentran constantemente tapetes de algas intermareales y condiciones hipersalinas.

La Bahía de San Quintín se localiza a poco más de 200 km al sur de Ensenada, sobre la costa occidental de la Península de Baja California, México. Está situada entre los

30°24' y 30°30' de latitud norte, 115°57' a 116°01' de longitud oeste. La forma de la Bahía es producto de las formaciones volcánicas localizadas en el extremo noroeste y entre los brazos de la Bahía. El brazo este se le denomina Bahía de San Quintín y tiene una longitud aproximada de 11 km; el brazo oeste se le conoce como Bahía Falsa, tiene una longitud de 7 km. El 40% de la laguna queda expuesto durante las mareas más bajas que el nivel medio del mar (nmm), el fondo de la bahía y en especial el brazo este, se caracterizan por tener un fondo uniforme, formado por pequeños promontorios fangosos, cubiertos en abundancia por praderas de pastos marinos (*Zostera marina*) entre los cuales existe una red dendrítica de canales que intersectan toda esta superficie y lo conectan con el canal principal en cada brazo.

Colecta: La toma de muestras se realizó el 1 de octubre de 1999. Se ubicaron 9 sitios de muestreo, caracterizados como reservorios someros con polígonos de desecación y tapetes microbianos, natas y costras superficiales.

V.I.5 Comisión Federal de Electricidad, campo Geotérmico, Cerro Prieto, B.C.,

México. Región con condiciones de temperatura extremas y zonas salinas, donde se ubican estructuras análogas a los tapetes microbianos. La zona Geotérmica de Cerro Prieto, se encuentra ubicada en la planicie aluvial del Valle de Mexicali, 30 km al sureste de la ciudad de Mexicali, Baja California, entre los meridianos 115°12' y 115°18' longitud oeste y los paralelos 32°22' y 32°26' de latitud norte, destacando como rasgo geográfico el volcán de Cerro Prieto que alcanza una elevación de 260 msnm. El campo de explotación cubre una superficie aproximada de 12 km². La región es árida con clima extremoso, variando su temperatura de -2°C en invierno a

47°C en verano, siendo las lluvias muy escasas con una precipitación media anual de 80 mm.

Colecta: La colecta de muestras se realizó el 19 de noviembre de 1999. Se localizaron 6 sitios de muestreo: Caracol Central, Laguna de Evaporación, Laguna Vulcano, Drenaje de la Laguna de Filtración, Salida de agua de Vapor Condensado y Curva de Manifestaciones (Antiguo campo de la C.F.E.).

V.2 Procedimiento de muestreo. Las muestras ricas en cianobacterias de los tapetes microbianos bentónicos fueron separados mecánicamente con una espátula y transportados en recipientes con gran cantidad de agua natural en una proporción 1:20. Para aquellas muestras que se encontraron expuestas al aire e incrustadas en suelos salinos, fueron transportadas en bolsas de plástico y oscuras.

V.3 Transporte de las muestras. Las muestras fueron transportadas a temperatura ambiente para no ocasionar proliferación o inhibición del crecimiento de las poblaciones microbianas autóctonas (Rippka, 1988).

V.4 Medición de variables fisicoquímicas. Se realizaron mediciones de temperatura, salinidad, oxígeno y pH durante la colecta de muestras. La temperatura se midió con un termómetro de mercurio (-20° a 120°C); la salinidad con un refractómetro de temperatura compensada (Modelos 10419 y 10423); el oxígeno con un oxímetro YSI158 (YSI Modelo 58 y el electrodo YSI5905/5010) y el pH se midió en el medio y en las muestras utilizando un potenciómetro Cole Parmer (Modelo Vernon Hills, Illinois 60061, pH Testr BNC).

V.5 Selección del medio de cultivo. El medio ASNIII se utilizó para el crecimiento, aislamiento y purificación de cianobacterias marinas con requerimientos mayores de sales

minerales (Rippka *et al.*, 1981). Además se utilizaron los medios MN para cianobacterias marinas, SOT (Marquez *et al.*, 1995) para *Spirulina* sp. y BG-11 para cianobacterias de agua dulce.

V.5.1 Elaboración del medio de cultivo líquido. Para la elaboración del medio de cultivo líquido ASNIII se requiere lo siguiente :

Reactivos	g l ⁻¹
NaCl	25.0
MgCl ₂ 6H ₂ O	2.0
KCl	0.5
NaNO ₃	0.75
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	0.02
MgSO ₄ 7H ₂ O	3.5
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.5
Acido cítrico	0.003
Citrato férrico de amonio	0.003
EDTA (sal disódica)	0.0005
NaCO ₃	0.02
Agua desionizada	1000 ml
pH (después de esterilizar)	7.5

La solución mineral se esteriliza por autoclave a 15 g cm⁻² de presión, durante 20 minutos.

Metales traza A5 + CO	mg l ⁻¹
H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ 2H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.222
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.390
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.079
Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	0.0494

La solución de metales traza se esteriliza por separado de la solución mineral (Stal y Krumbein, 1985) y se almacena en refrigeración a 4°C hasta su uso.

Algunas cianobacterias, especialmente las marinas requieren de vitamina B₁₂, por lo que fue agregada al cultivo de las cepas de este trabajo en una concentración de 10 µg l⁻¹ de cianocobalamina (Rippka, 1988).

V.5.2 Elaboración del medio de cultivo sólido. Para la elaboración de medio sólido fue necesario disolver primero la solución mineral y después adicionar el agar (concentración final: 1.0 %). La esterilización se realizó por autoclave a 15 g cm⁻² de presión por espacio de 20 minutos

Una vez esterilizados el agar y la solución mineral, se le adicionó la solución de metales traza y la vitamina, y se vaciaron en cajas petri de plástico estériles; una vez solidificadas, se sellaron con parafilm y se cubrieron con bolsas de plástico para ser almacenadas en el refrigerador a 4°C hasta su uso (Thiel *et al.*, 1989).

V.6 Obtención de cianobacterias.

Las muestras obtenidas de los lugares de muestreo se inocularon en medio ASNIII líquido (10 ml) y sólido con ciclohexamida (50, 100 y 200 mg ml⁻¹) para la primera eliminación de organismos eucariotas (ASNIIIc). Las muestras en medio líquido se incubaron por un periodo de 6 a 8 semanas con fotoperiodo (12 h luz:12 h oscuridad), una intensidad de luz de 25 µEm⁻²s⁻¹ y un intervalo de temperatura de 25 a 30 °C para permitir el crecimiento de las cianobacterias. Las cajas Petri inoculadas se mantuvieron incubando por lapsos de 2 a 4 semanas en las mismas condiciones anteriores. Todas las muestras se observaron diariamente bajo un microscopio óptico para monitorear la aparición de crecimiento de cianobacterias en medio líquido y con un microscopio estereoscópico para

las muestras en medio sólido y aquellos que presentaron crecimiento de filamentos o colonias aisladas se transfirieron por los métodos de bloque invertido y con capilares.

Una vez obtenido crecimiento en medio líquido, se cosecharon las muestras a 3,500 rpm por 10, 15 y 20 minutos para eliminar el sobrenadante y obtener el botón celular que se forma para después inocularlo en tubo con 15 mL de medio ASNIII fresco; después de dos semanas se realizó la técnica de dilución seriada (de 1:10 a 1:10⁵) para cianobacterias unicelulares (Figura 4). Los filamentos que crecieron en las paredes del vidrio, se tomaron con un asa y pipeta Pasteur, y se transfirieron a un tubo con medio ASNIII fresco. Todas las muestras a su vez se estriaron en medio sólido para su posterior transferencia. Una vez realizado todo lo anterior se adicionó ASNIII hasta un volúmen de 80 mL de donde se partió al escalamiento de los cultivos.

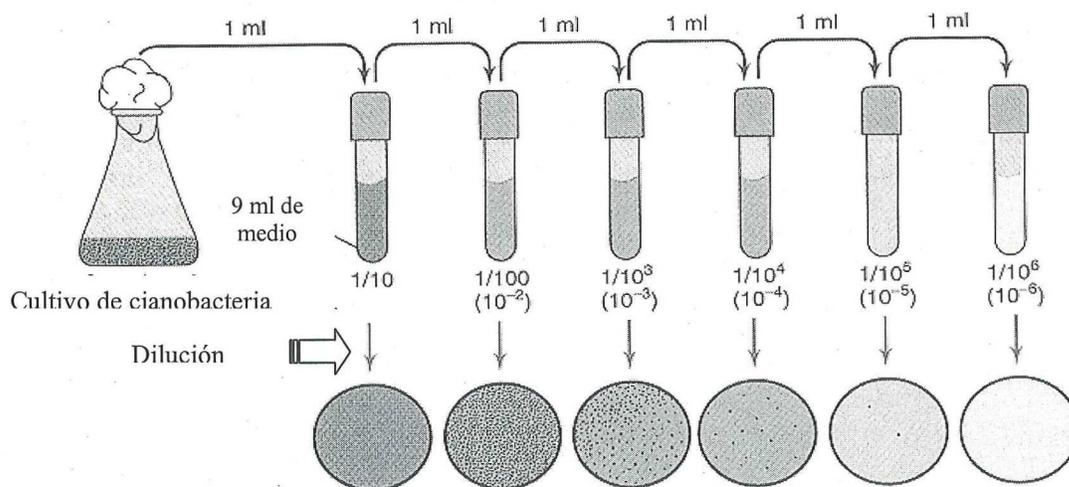


Figura 4. Técnica de dilución seriada utilizada en el aislamiento de cianobacterias.

V.7 Técnicas de aislamiento de cianobacterias.

V.7.1 Técnica de dilución seriada. Se tomaron alícuotas de las muestras con una espátula pequeña y fueron colocadas en tubos de ensaye con 10 ml de medio ASN III; las muestras fueron homogenizadas en un agitador VORTEX hasta lograr la dispersión total de las muestras. Una vez homogeneizadas se procedió a realizar las diluciones seriadas (de 1:10 a 1:10⁵) transfiriendo 1 ml de la suspensión celular a tubos de ensaye con 9 ml de medio ASN III líquido estéril. De cada una de las diluciones, se inocularon 200 µl de la suspensión celular en cajas petri con medio ASN III sólido (Figura 4).

V.7.2 Técnica de vaciado en placa. Esta técnica se utilizó debido a que tiene como finalidad la obtención de colonias dispersas en el medio sólido (Stal y Krumbein, 1985).

V.7.3 Técnica de transferencia por bloque invertido. De un cultivo que presentó crecimiento significativo de filamentos, se procedió a cortar y transferir un bloque de la superficie del agar al centro de otra placa fresca y estéril. En algunos casos esto se realizó previa extracción de un bloque de las mismas dimensiones que el transplantado.

V.7.4 Aislamiento por deslizamiento y fototactismo. Para la aplicación de esta técnica, fueron utilizadas placas con medio de cultivo ASN IIIc (con ciclohexamida) y ASN III, las cuales fueron expuestas a una fuente de luz unidireccional con el fin de aislar a las cianobacterias con base a su respuesta fototáctica (Rippka *et al.*, 1979).

Las placas con crecimiento de filamentos más alejados de su base de crecimiento fueron colectados con pipetas capilares Pasteur de 0.1-0.2 mm de diámetro y con agujas de disección estériles bajo el microscopio estereoscópico. Los filamentos fueron transferidos e

inoculados al centro de placas con medio sólido fresco y estéril. El deslizamiento de los filamentos se observó diariamente en un microscopio estereoscópico.

V.7.5 Aislamiento por medios mecánicos. De los cultivos en placa con crecimiento significativo, se seleccionaron los filamentos más alejados del lugar del inóculo. Bajo un microscopio estereoscópico, se separaron los filamentos con la ayuda de una pipeta capilar Pasteur y se suspendieron en 5 ml de medio líquido de ASN III estéril; éstos fueron inoculados, estriados e incubados a las condiciones antes mencionadas.

V.8 Obtención de extractos.

Los extractos fueron obtenidos a partir de cultivos de cianobacterias en fase de crecimiento estacionaria. Para la actividad antimicrobiana y toxicológica se obtuvieron utilizando la mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1) (Harrigan *et al.*, 1998). De las muestras liofilizadas se pesaron 0.4 g que se ocuparon para la extracción. Se realizaron dos extracciones cada una de 50 mL de mezcla y un tiempo de extracción de 1:45 h para la primera y 1 h para la segunda extracción. Seguido de esto, las muestras se evaporaron a sequedad y se guardaron en refrigeración (4 °C) hasta su utilización. Una vez comprobada que la mezcla utilizada para la extracción no era tóxica, esta misma se utilizó para la dilución de los extractos con 5 ml (Tabla IV). Por otra parte, 0.4 g de muestra liofilizada se dejaron en agitación durante 20 h con 200 ml de la mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1) y 80 mg del extracto crudo se resuspendió en 5 ml de mezcla y se pasó por una columna de sílica gel, la cual se eluyó con 100 ml de CH_2Cl_2 seguido de 100 ml de CH_3OH . De la elución se obtuvieron 20 fracciones de diclorometano y 20 fracciones de metanol, cada una de ellas de 5 ml para cada cepa, obteniéndose un total de 280 fracciones. Con la finalidad

de reducir el número de fracciones y agruparlas por propiedades similares, se realizaron barridos de lecturas en el intervalo UV-VIS (200-700 nm). Las fracciones eluidas con diclorometano y que mostraron espectros de absorción similares se mezclaron. De esta manera se obtuvo 1 fracción por cepa. Las fracciones provenientes de la extracción con metanol, se les aplicó el mismo procedimiento y de esta forma se obtuvieron 17 fracciones en total.

V.9 Pruebas de antibiosis.

Para determinar la actividad antimicrobiana se usaron los ensayos de discos en placa y la técnica de vaciado de la doble capa de agar. Antes de comenzar las pruebas de antibiosis, se evaluó la toxicidad de los disolventes utilizados en la extracción. Este ensayo fue necesario para corroborar si existía o no un efecto de inhibición de crecimiento causado por el solvente utilizado para disolver los extractos. Se utilizó tanto la mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1), cada uno de éstos por separado, así como isopropanol. Los antibiogramas se realizaron por el método de difusión en placa (Kirby-Bauer). Asimismo, se realizó una selección del control positivo, utilizando los siguientes antibióticos: Penicilina G, Ampicilina, Imipenem, Cloramfenicol, Gentamicina, Espectinomicina, Kanamicina, Eritromicina, Ofloxacina, Amikacina, Trimetoprim/Sulfametoxazol, Tetraciclina, y con las concentraciones siguientes: 2, 5, 10, 25 y $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ para los primeros 5 antibióticos y sólo con $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ para el resto. De esta manera se seleccionó el antibiótico y el halo utilizado para comparar la actividad de los extractos de cianobacterias marinas (Tabla V). Los microorganismos utilizados (Tabla I) fueron bacterias Gram (-) tal como *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*,

Klebsiella sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens* y bacterias Gram (+) como *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, bacteria patógena resistente a los antibióticos existentes. *Candida albicans* se utilizó como un patógeno típico de levaduras. *B. subtilis*, *C. albicans*, *E. fergusonii*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella* sp., *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *S. marcescens* y *E. coli* fueron crecidos en el medio Luria-Bertani (LB) a una densidad de 0.5 medida a una longitud de onda de 600 nm; *S. aureus* fue crecida en medio LB modificado a una densidad de 0.5, medida a una longitud de onda de 660 nm.

Tabla I. Microorganismos utilizados para determinar la actividad inhibitoria de los extractos de cianobacterias.

CEPA	FUENTE
<i>E. coli</i>	W. Fenical, 1998*
<i>B. subtilis</i>	W. Fenical, 1998*
<i>S. aureus</i>	W. Fenical, 1998*
<i>C. albicans</i>	W. Fenical, 1998*
<i>P. aeruginosa</i>	UABC
<i>P. fluorescens</i>	UABC
<i>P. vulgaris</i>	UABC
<i>S. marcescens</i>	UABC
<i>K. pneumoniae</i>	UABC
<i>E. fergusonii</i>	Urocultivo**
<i>C. albicans</i>	Cervicovaginal**
<i>P. mirabilis</i>	Urocultivo**
<i>C. freundii</i>	Urocultivo**
<i>Klebsiella</i> sp.	Coprocultivo**
<i>P. aeruginosa</i>	Lav. Bronquial**

*Scripps Institution of Oceanography, UCSD (Center for Marine Biotechnology and Biomedicine). **Aislados de pacientes (donación anónima).

La reactivación de las cepas se llevó a cabo sembrando una asada de muestras de células en cajas Petri con su respectivo medio. La concentración celular fue determinanda

con base a la turbidez medida (por duplicado) en un espectrofotómetro-Elyptica con un intervalo del ancho de banda entre 2.8 y 3.5 nm.

V.9.1 Método de Difusión en placa (Figura 5). Los ensayos de antibiosis se realizaron utilizando el método de difusión en placa (Método Kirby-Bauer), mediante el uso de discos de papel de 6.5 mm de diámetro impregnados con cantidades (7, 25 y 30 μ l) conocidas de los extractos (Ichikawa y Date, 1971). Los discos secos, se colocaron sobre las placas petri inoculadas con los microorganismos y se dejaron difundir a 4°C por 24 horas; después de éste tiempo se colocaron en incubación a 37°C para permitir el crecimiento de las cepas bacterianas. La formación de los halos de inhibición alrededor de los discos se tomó como una indicación de la producción de por lo menos un metabolito antimicrobiano.

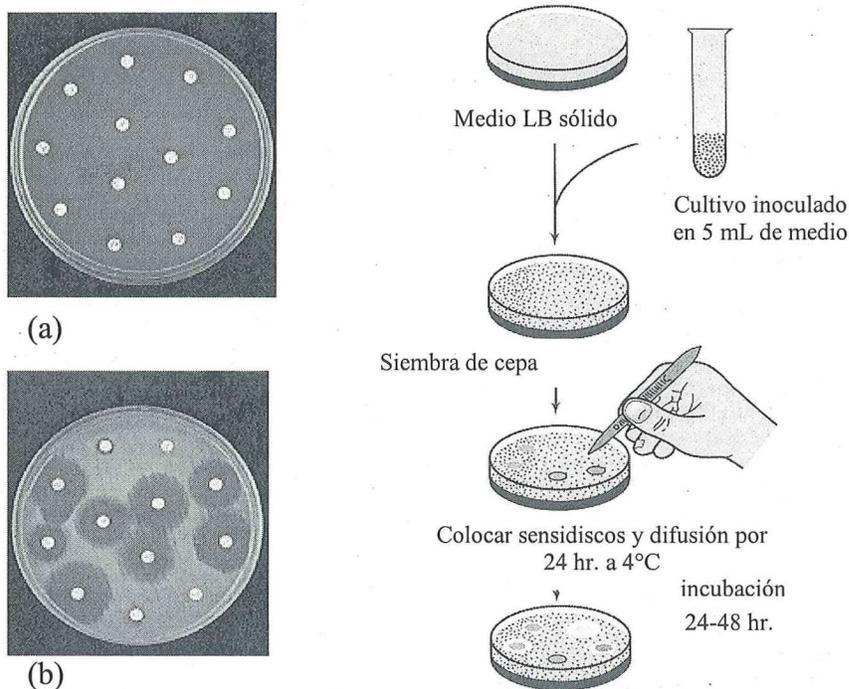


Figura 5. Técnica de difusión en agar (Método de Kirby-Bauer). a) Colocación de los discos en el agar. b) Formación de halos de inhibición.

V.9.2 Método de dilución (Figura 6). Esta metodología se utilizó para corroborar los datos de actividad obtenidos con el método de Kirby-Bauer en los extractos de la primera estrategia. Los ensayos en solución líquida se utilizaron para determinar coloriméricamente los valores MIC. Dichos experimentos se realizaron en placas de 96 pozos.

Los cultivos microbianos (*B. subtilis*, *E. coli*, *C. albicans* y *S. aureus*) con una densidad óptica entre 0.8-1.0 medida con sus respectivas absorbancias, se diluyeron (1:100) y 200 μ L de éste cultivo se adicionan a todos los pozos. Posteriormente se adicionaron 50 μ L del extracto a probar en la primera fila de pozos y se mezclaron, de ahí se tomaron otros 50 μ L que se adicionaron a la siguiente fila y así sucesivamente hasta descargar los últimos 50 μ L. La placa se dejó incubando toda la noche en agitación. El cambio de coloración se observó a simple vista.

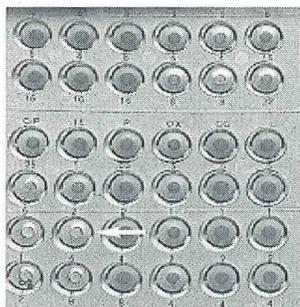


Figura 6. Técnica de dilución para la obtención de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC). La flecha indica la concentración mínima en la cual no se presentó crecimiento.

V.10 Prueba de toxicidad. Para determinar la toxicidad de los compuestos es posible emplear bioensayos a partir de los extractos obtenidos de cultivos de cianobacterias. Uno

de éstos es el que se llevó a cabo en *Artemia* (Salt Creek) utilizando un método desarrollado por McLaughlin (1991), el cual es un buen indicador de la toxicidad de los compuestos, presentando un coeficiente de correlación del 90 % con células de líneas celulares (90% de todos los compuestos tóxicos de *Artemia* son tóxicos para las células de cáncer humano). Antes de comenzar los bioensayos, se evaluó la toxicidad de los disolventes utilizados en la extracción y se estandarizó el número de nauplios utilizados en cada pozo. Para estos ensayos, 15 organismos en estadio de nauplio I-III (Figura 7) de *Artemia* se colocaron en los pozos con agua marina fresca (150 μ l). Las fracciones de CH_2Cl_2 y CH_3OH a probarse se adicionaron a los nauplios de *Artemia* y su viabilidad se evaluó después de 24 horas.

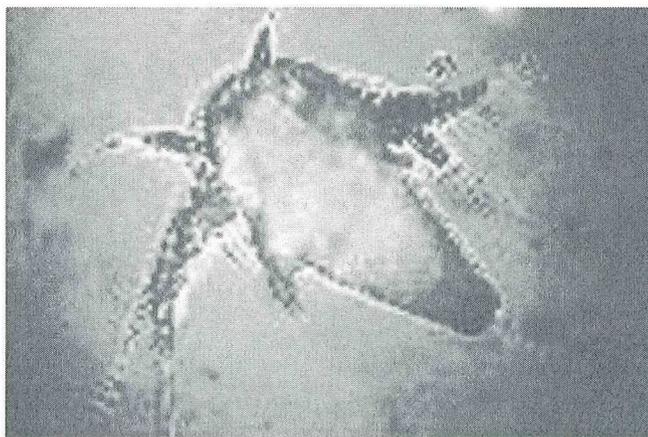


Figura 7. Estadio de nauplio II de *Artemia* utilizado en los bioensayos de toxicidad.

Cada una de las fracciones obtenidas, según la sección (extractos), se llevaron a sequedad y se recuperaron en un mínimo volumen de disolvente. Las fracciones de CH_2Cl_2 se

disolvieron en 1.5 ml de agua de mar filtrada y pasada por luz UV; las fracciones de CH₃OH se disolvieron en este mismo disolvente (2 ml).

V.11 Clasificación de cianobacterias.

V11.1 Taxonómica. Las cepas de cianobacterias con actividad biológica se identificaron fenotípicamente a nivel de género y en algunos casos hasta especie, utilizando los métodos descritos en Anagnostidis y Komárek (1988), Geitler (1925) y Desikachary (1959).

V.11.2 Métodos moleculares. Para la caracterización a nivel molecular, el ADN cromosomal se aisló por el método reportado por Kuhlemeier *et al.* (1984). El análisis molecular se realizó por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos específicos para cianobacterias (Wilmotte *et al.*, 1993). Las secuencias de los oligos utilizados son : 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' (ARNr 16S-univ) la cual hibrida con la parte inicial del gen que codifica para el ARNr 16S de procariotas y 5' GCT CTG TGT GCC TAG GTA TC 3' (ARNr 23S-ciano) el cual hibrida con la parte inicial del gen que codifica para el ARNr 23S de cianobacterias. De esta manera, se está amplificando el gen que codifica para el ARNr 16S y la secuencia intergénica (ITS) o región espaciadora 16S-23S.

La estandarización se llevó a cabo mediante pruebas con los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la ITS (16S-23S) (Wilmotte *et al.*, 1993). Para ello, primero se realizó una amplificación por PCR utilizando directamente 1.0 µl del cultivo en matraz, según la metodología estandarizada en el Laboratorio de Microbiología Marina (CICESE), para la obtención de fragmentos de ADN de entre 2,000 y 2,300 pares de bases

(pb). Los cultivos utilizados fueron: *Phormidium okeni* I, *Phormidium okeni* II, *Synechococcus elongatus*, *Synechocystis pevaleki* y *Aphanothece bullosa* (Tabla IX, Figura 18).

El hecho de realizar ampliaciones por PCR de la región espaciadora directamente de las muestras de cultivo, ahorra el paso de la purificación del ADN cromosomal.

La reacción que se llevó a cabo en solución (Sambrook *et al.*, 1989) fue la siguiente:

	μl
H ₂ O	15.41
dNTP's	0.4
Buffer 10X	2.0
Oligo UNIV (dil. 1:10)	0.57
Oligo CIANO (dil. 1:10)	0.42
DNA crom. o cultivo	1.0
Taq polimerasa	0.2
Total	20.0 μL

La amplificación por PCR se llevó a cabo en un Termociclador GeneE (TEHNE, INC., 1996 New Jersey, USA). Después del paso de desnaturalización a 95 °C por 10 minutos, se llevaron a cabo 30 ciclos de amplificación. Las temperaturas y el tiempo usados en cada ciclo fueron las siguientes: 95 °C por 1 min., 60 °C por 1 min. (T_m) y 72 °C por 4 min. y un sólo ciclo de 72 por 7 min. La T_m es la temperatura óptima de hibridación de los oligos utilizados.

Los productos de PCR y el ADN cromosomal se corrieron en un gel de agarosa al 1.2%, el cual se observó con un transiluminador de luz ultravioleta para poder identificar los fragmentos resultantes.

V.11.2.1 Análisis de restricción teórico. Las secuencias de los genes que codifican para el ARNr 16Sr, 23S e ITS de diversos géneros de cianobacterias, se obtuvieron del Banco de Datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) tales como el GenBank; dichas secuencias se editaron en el Programa DNASTar y después se alinearon en MegAlign, donde se realizó el análisis de restricción teórico (Figura 23). A partir de este análisis se seleccionaron las enzimas a utilizar para realizar el análisis de restricción experimental.

V.11.2.2 Análisis de restricción experimental. El producto de PCR de 2.1 Kb, obtenido de la amplificación en el termociclador se digirió con las enzimas seleccionadas del análisis de restricción teórico, durante diferentes tiempos (1 h, 1:30 h y 3 h). La estandarización de este análisis se llevó a cabo con la cepa 17bSQ. Los fragmentos de la digestión del producto de PCR se observaron en geles de agarosa al 2% (80 V/1:30 h).

V.12 Mantenimiento de los cultivos. Los cultivos de cianobacterias mono-específicos y axénicos se mantuvieron en ampulas de 2 ml de medio ASN III y Dimetilsulfóxido (5% v/v). Dichas cepas se preservaron en Ultracongelador a -70°C (Rippka *et al.*, 1981).

Las cepas *B. subtilis*, *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus* fueron preservadas en ultracongelador a -70°C con glicerol al 15 % como criopreservador.

VI. RESULTADOS

VI.1 Estructura de los tapetes microbianos.

Los microorganismos de los manantiales termales de Santispac (Figura 8), crecen y se desarrollan como filamentos y natas macroscópicamente visibles. La estructura está compuesta principalmente de cianobacterias filamentosas pertenecientes a los géneros: *Leptolyngbya* y *Limnothrix*, y una bacteria fototrófica anoxigénica conocida como *Chloroflexus*.



Figura 8. Filamentos de cianobacterias marinas de aberturas termales de Bahía Concepción, B.C.S., México. Foto: López-Cortés, A.

En este lugar se observaron cianobacterias unicelulares de los géneros *Aphanotece* y *Chroococcus*, además de géneros como: *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Synechococcus*, *Synechocystis* y *Gleocapsa*, entre otros.

Los tapetes microbianos de Guerrero Negro, B.C.S. (Figura 9), se caracterizaron por estar sumergidos y mostrarse expuestos dependiendo de la estación del año. De manera regular son polígonos dominados por cianobacterias filamentosas constructoras de tapetes y

hasta el momento se tienen identificados los géneros siguientes: *Microcoleus*, *Lyngbya*, *Oscillatoria* y *Calothrix*.

Los tapetes mostraron secciones transversales con un patrón de laminación colorido. La capa del fondo fue rica en bacterias heterótrofas y junto con el aislamiento de las cianobacterias se presentó contaminación por cepas del género *Bacillus*.

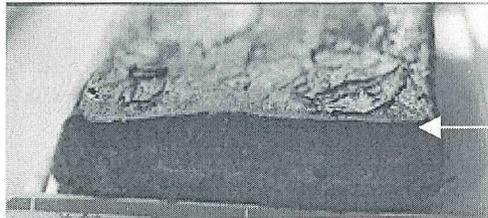


Figura 9. Tapete microbiano (→) característico de los vasos concentradores de sal de Guerrero Negro, B.C.S., México. Foto: Simental-Trinidad, J.A.

En el sitio del Brazo de San Quintín, fueron evidentes los tapetes microbianos laminados planos que macroscópicamente se observan como polígonos de desecación (Figura 10). Las secciones transversales de estos mostraron un patrón de laminación colorido.



Figura 10. Polígonos de desecación del Brazo de San Quintín, B.C., México. Foto: Torres-Ariño, A.

En las muestras del Campo Geotérmico de Cerro Prieto, los microorganismos del Drenaje de Filtración se caracterizaron por estar sumergidos y los de la Curva de manifestaciones expuestos; ambos crecen y se desarrollan como natas macroscópicamente visibles y están expuestos a altas temperaturas (Figura 11). La estructura de los mismos está compuesta principalmente de cianobacterias filamentosas pertenecientes a los géneros:



Figura 11. Natas superficiales compuestas de cianobacterias (A) y bacterias heterótrofas (B), Mexicali, B.C., México. Foto: Torres-Ariño, A.

Lyngbya, *Anabaena*, *Oscillatoria* y unicelulares como: *Gleothoece*, *Synechococcus* y *Aphanothece*. En el sitio de la Curva de Manifestaciones fue evidente el crecimiento de bacterias heterótrofas y anoxigénicas.

Por las condiciones de la zona de muestreo se obtuvieron cepas de cianobacterias de agua dulce (Drenaje de Filtración) y marinas (Curva de Manifestaciones). Estas cianobacterias se utilizaron sólo para formar parte de la colección de cianobacterias del Laboratorio de Microbiología Marina del CICESE debido a que los cultivos se escalaron a nivel de tubo con 40 ml de medio ASN III.

En estos sitios, la parte fotótrofa de los tapetes se localizó en los primeros 2 a 3 mm y en algunas ocasiones hasta los 5 mm. La lámina superficial estuvo compuesta por varios tipos de cianobacterias filamentosas y unicelulares. Por debajo de la estratificación verde se localizó una lámina roja-púrpura compuesta por bacterias anoxigénicas (fotótrofas que no liberan oxígeno). Igualmente que los tapetes de Guerrero Negro, la estratificación negra del fondo estuvo compuesta principalmente por bacterias heterótrofas y anaerobias.

En las muestras de *M. galloprovincialis* (Figura 12) obtenidas de la empresa BGB Acuacultura, se observó dominancia por cianobacterias filamentosas pertenecientes a los géneros: *Spirulina*, *Calothrix*, *Oscillatoria* y *Phormidium*. De estas muestras se logró aislar y purificar la cianobacteria filamentososa *Spirulina subsalsa*.



Figura 12. Mejillones (*M. galloprovincialis*) colectados del estanque de reproductores de la empresa BGB Acuacultura. Foto: Anónimo.

VI.2 AISLAMIENTO.

De las técnicas de aislamiento que se utilizaron, sólo tres de ellas fueron las que dieron resultados positivos para la obtención de crecimiento de cianobacterias: La manipulación directa de los filamentos extraídos de los tapetes microbianos por medios mecánicos, la constante transferencia en bloque invertido de los mismos y su exposición continua hacia una fuente de iluminación unidireccional (Tabla II).

Tabla II. Técnicas utilizadas para el aislamiento y eliminación de contaminantes biológicos.

Método de aislamiento	Resultado	Observaciones
Vaciado en placa	-	Contaminación por otras cianobacterias.
Transferencia por bloque invertido	+	Ninguna
Deslizamiento y fototactismo	+	Contaminación por bacterias heterótrofas.
Medios mecánicos	++	Rompimiento y degeneración de células.
Antibióticos	+	Ninguna
Ciclohexamida	++	Eliminación de eucariotas y favorecimiento de bacterias heterótrofas.
Imipenem	++	Desintegración del tricoma (24 h).
Cefoxitina	++	Eliminación de bacterias heterótrofas.

(-) Negativo.

(+) Positivo.

Los filamentos que se inocularon en medio sólido migraron hacia la luz por presentar fototactismo positivo, lo que facilitó su manipulación y recuperación al encontrarse libres de contaminantes (excepto de bacterias heterótrofas) provenientes del tapete microbiano. Con la técnica de dilución seriada fue posible la recuperación de

cianobacterias cocoidales como *Synechococcus* sp. y *Synechocystis* sp. Con la técnica de vaciado en placa se observó que algunos de los filamentos migraban pero no se observó crecimiento de los mismos y al cabo de 48 hrs. presentaron contaminación por bacterias heterótrofas mismas que en su ambiente natural se encuentran adheridas a sus vainas, ricas en exopolisacáridos.

Las condiciones generales que favorecieron el crecimiento de las cianobacterias aisladas fueron: Medio de cultivo ASNIII, temperatura de incubación de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, aireación por burbujeo constante y una iluminación de $25\text{-}50 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Las características particulares de cada cepa se muestran en el apartado de la Colección de Cianobacterias.

VI.2.1 Eliminación de contaminantes biológicos.

Para la purificación de algunas de las cepas de cianobacterias, el empleo de cefoxitina resultó en la eliminación de las bacterias heterótrofas asociadas a las cianobacterias; exposiciones prolongadas (24 h) al antibiótico Imipenem mostró patrones de desintegración de los tricomas. El tiempo de exposición óptimo de los antibióticos en las cianobacterias fue de 2 h para imipenem y 18 h para cefoxitina (Torres-Ariño, 1997). Para los tapetes de San Quintín que se encontraban contaminados con un protozoario, identificado como *Vorticella*, fue posible su eliminación mediante una combinación de las técnicas de aislamiento y el uso de antibióticos como la ciclohexamida; además de centrifugación del cultivo a 3000 rpm y una disminución del pH a 5.0 con inyección de CO_2 proporcionado por el Laboratorio de Microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE, bajo la supervisión de la Dra. Beatriz Cordero.

La utilización de ciclohexamida, resultó efectiva para el aislamiento y limpieza de las cianobacterias, lo que originó colonias y filamentos libres de organismos eucariotas, aunque más tarde, ésto favoreció la aparición de bacterias heterótrofas.

VI.3 OBTENCION DE EXTRACTOS DE CIANOBACTERIAS.

Se utilizaron en total 13 cepas de cianobacterias y dos estrategias para la obtención de los extractos (Tabla III). Los 8 extractos que aparecen en la tercera columna, provienen de la primera estrategia y se les asignó la clave DM debido a que se extrajeron con la mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1), (1 por muestra). Las columnas sexta y séptima, representan las fracciones obtenidas por elución a partir de las 280 fracciones obtenidas de la segunda estrategia, donde a partir de 7 cepas se obtuvieron 7 fracciones de CH_2Cl_2 (D) y 17 de CH_3OH (M).

Tabla III. Relación de extractos de cianobacterias utilizados en este estudio.

Estrategia I (Harrigan <i>et al.</i> , 1988)			Estrategia II (Papendorf <i>et al.</i> , 1998)		
Cepa	Clave	Extracto	Cepa	Clave	Fracción
<i>Oscillatoria</i> sp.	E6GN9808-6	1DM	ND	O3UABC*	AD A1M, A2M
<i>S. elongatus</i>	SP2A9606-8	2DM	<i>S. elongatus</i>	SEBC9908-2	BD B1M, B2M, B3M
<i>P. okeni</i> I	PCP2B9510-I	3DM	<i>Oscillatoria</i> sp.	E6GN9908-6	CD C1M, C2M
<i>P. okeni</i> II	PCP2b9510-II	4DM	<i>Oscillatoria</i> sp.	E6BC9908	DD D1M, D2M
<i>P. rubrum</i>	PCB9602-6	5DM	<i>P. okeni</i> I	PCP2b9510-I	ED E1M, E2M, E3M
<i>S. subsalsa</i>	GEDA9910-IV	6DM	ND	E4GN9908-4	FD F1M, F2M
<i>Oscillatoria</i> sp.	D2100EGA-5	7DM	ND	17bSQ9910	GD G1M, G2M, G3M
<i>A. bullosa</i>	UNIC9808-2	8DM			

DM= $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1); D= CH_2Cl_2 ; M= CH_3OH

* Posiblemente se trate de una microalga.

ND= No determinado

Los espectros de absorción en el intervalo de los rayos ultravioleta, se realizaron para observar si existía un indicio de la presencia de algún compuesto orgánico absorbente

a los intervalos de longitud de onda entre 200 y 700 nm (Sección de Anexos). En todas las fracciones, ya sean de diclorometano o de metanol, se formó un hombro aproximadamente en los 275 y 280 nm. A partir de los espectro de absorción y por propiedades químicas similares, se logró reducir de 280 fracciones a 7 de diclorometano y 17 de metanol como se observa en la tabla III.

VI.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

En la Tabla IV se muestran los resultados obtenidos de las pruebas para la selección del control positivo. De los 15 antibióticos comerciales que se probaron para este fin, se seleccionó al Imipenem por ser un antibiótico de amplio espectro y mostrar halos de inhibición en todas las cepas utilizadas.

Los extractos de cianobacterias con las claves E6GN9908-8, SP2A9606-8, PCP2B9510-I, PCP2B9510-II, PCB9602-6, GEDA9910-I y D2100EGA-5 (Tabla III) obtenidos con la mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1) no mostraron actividad antimicrobiana contra ninguna de las cepas bacterianas utilizadas en este estudio (Tabla I) tanto en las realizadas con la técnica de difusión en agar (Método Kirby-Bauer) como con la técnica de dilución (sólo realizada con los extractos obtenidos con la estrategia I). En las fracciones de CH_2Cl_2 la actividad antimicrobiana resultó negativa en la mayoría de las cepas ensayadas. Para *K. pneumoniae* se obtuvieron halos de inhibición de 7,0 mm (Tabla Vb). Las fracciones de CH_3OH mostraron halos entre 6,5-8,0 mm contra *K. pneumoniae* (Tabla Vb) y halos de 7,0 mm contra *P. aeruginosa* (Tabla Va). Con las demás fracciones no se obtuvo actividad antimicrobiana.

Tabla IV. Antibióticos probados para la selección del control positivo en los ensayos de actividad antimicrobiana en cianobacterias. Ampicilina (Amp), Tetraciclina (Tet), Imipenem (Imi), Penicilina G (PeG), Gentamicina (Ge), Kanamicina (Ka), Cloramfenicol (Clo), Espectinomicina (Es), Eritromicina (Er), Amikacina (Am), Trimetropim/Salfametoxazol (TMP) y Ofloxacina (Of).

CEPA	Amp	Tet	Imi	PeG	Ge	Ka	Clo	Es	Er	Am	TMP	Of
<i>E. coli</i>	R	R	S	S	R	R	S		I	S	R	R
<i>E. fergusonii</i>	R	I	I		S					S	R	S
<i>C. freundii</i>	I		S/I		S					S	S	S
<i>P. aeruginosa</i>			S	R	S					S	R	R
<i>P. fluorescens</i>			I	R								
<i>Klebsiella sp.</i>			I									
<i>K. pneumoniae</i>			I	I								
<i>B. subtilis</i>	I		I	I	I/S	I/S						
<i>P. mirabilis</i>	R	R	S		R					S	R	S/R
<i>P. vulgaris</i>	R	R	R/I		R					S		S
<i>C. albicans</i>			R	R		I/R	I/R	R	R			
<i>C. albicans</i> VVAG			R	R		S/I	S/I	R	R			
<i>S. marcescens</i>			R									
<i>S. aureus</i>	I/S		I	I								

R=Resistente; I=Intermedio; S=Sensible; Blanco=Dato no disponible o antibiótico no aconsejable o probado.

Tabla V. Actividad antimicrobiana de los extractos de cianobacterias marinas. a) *Pseudomonas aeruginosa*, b) *Klebsiella pneumoniae*.

a) *Pseudomonas aeruginosa*

Extracto	Cepa	Halo (mm)
E2M	PCP2B9510-I	7.0
G1M	17bSQ9910	7.0
G3M	17bSQ9910	7.0

M=Metanol

b) *Klebsiella pneumoniae*

Extracto	Cepa	Halo (mm)
BD	SP2A9606-8	7.0
CD	E6GN9908-6	7.0
ED	PCP2B9510-I	7.0
FD	E4GN9908-4	7.0
B1M	SEBC9908-2	6.5-8.0
B2M	SEBC9908-2	6.5-8.0
B3M	SEBC9908-2	6.5-8.0
C2M	E6GN9908-6	6.5-8.0
D1M	E6GN9908-6	6.5-8.0
D2M	E6GN9908-6	6.5-8.0
E1M	PCP2B9510-I	6.5-8.0
E3M	PCP2B9510-I	6.5-8.0
F1M	E4GN9908-4	6.5-8.0
F2M	E4GN9908-4	6.5-8.0
G3M	17bSQ9910	6.5-8.0

D=Diclorometano, M=Metanol

VI.5 BIOENSAYO DE TOXICIDAD EN *Artemia*

El diclorometano resultó tóxico para *Artemia* en todas las concentraciones probadas. El 20% de mortalidad se presentó en las concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0%; Una mortalidad del 30% en la concentración del 2% de diclorometano y para las concentraciones 4, 8 y 10% del disolvente, se obtuvieron mortalidades del 100%. Por su parte, el metanol fue menos agresivo con los nauplios de *Artemia*; se probaron concentraciones de 0.8, 2, 4, 8, 10, 16 y 18%, presentando un 7, 10, 15, 25 y 32% de

mortalidad, respectivamente para las 5 primeras concentraciones y un 100% de mortalidad con 16 y 18% del disolvente.

Por lo anterior, para los bioensayos de toxicidad, las fracciones de diclorometano se evaporaron a sequedad y se resuspendieron en agua de mar filtrada y pasada por UV. Las fracciones de metanol no se evaporaron. La concentración final del disolvente en el medio de exposición fue del 2%.

Tabla VI. Mortalidad (%) de *Artemia* expuesta a fracciones de CH_2Cl_2 resuspendidas en agua de mar. La mortalidad del Blanco fue del 3.43 %.

Fracción	Mortalidad (%) Fracción (A)	Mortalidad neta (%) (Blanco-A)
AD	1.82	0.00
BD	1.70	0.00
CD	2.83	0.00
DD	0.00	0.00
ED	1.80	0.00
FD	9.13	5.70
GD	10.82	7.59
Agua de mar	3.45	0.00

La Tabla VI muestra el promedio de los porcentajes de mortalidad obtenidos con las fracciones de diclorometano. La fracción DD presentó 0% de mortalidad, es decir, no causó ningún efecto en el desarrollo de los nauplios; las fracciones AD, BD, CD y ED presentaron un rango de mortalidad de entre 1.7 a 2.83%. Las fracciones FD y GD presentaron un porcentaje de mortalidad de 9.13 y 10.82%, respectivamente. En cada uno de los bioensayos se corrió un blanco (disolvente tratado igual que los extractos) en donde se obtuvo un 3.43% de mortalidad y un control de agua de mar donde se obtuvo un 3.45% de mortalidad. Para conocer el efecto real (neto) de mortalidad de las fracciones, se restó el

porcentaje de mortalidad del blanco a cada uno de los porcentajes obtenidos de las fracciones. En la Tabla VI, se muestra que las únicas fracciones donde hay un efecto es en las fracciones FD y GD con un 5.7 y 7.59% de mortalidad, respectivamente. Sin embargo, los nauplios que sobrevivieron, mostraron un desarrollo hasta metanauplio.

Tabla VII. Mortalidad (%) de las fracciones de CH₃OH en *Artemia*, utilizando agua de mar como control. En el Blanco se obtuvo una mortalidad de los nauplios del 11.94 %

Fracción	Mortalidad (%) Fracción (A)	Mortalidad neta (%) (Blanco-A)
A1M	6.58	0.00
A2M	13.09	1.15
B1M	12.50	0.56
B2M	3.17	0.00
B3M	0.00	0.00
C1M	14.58	2.64
C2M	17.20	5.26
D1M	17.20	5.26
D2M	7.55	0.00
E1M	36.36	24.42
E2M	26.98	15.00
E3M	27.78	15.84
F1M	45.31	33.37
F2M	23.81	11.87
G1M	28.33	16.39
G2M	27.14	15.20
G3M	31.67	19.73
Agua de mar	12.31	0.37

Las fracciones de metanol presentaron mayor efecto en el desarrollo de los nauplios de *Artemia* como se observa en la Tabla VII, donde se muestran los promedios de los

porcentajes de mortalidad de cinco determinaciones. La fracción B3M fue la única en donde no se observó mortalidad de los nauplios. Las fracciones E1M, E2M, E3M, F1M, F2M, G1M, G2M y G3M presentaron los valores mayores de mortalidad, siendo F1M la que mostró el valor máximo de mortalidad con 45.31% y un valor neto de 33.37%. El valor del blanco de 11.94% de mortalidad, nos indica que el disolvente tuvo un efecto en los nauplios de *Artemia*. Al obtener el valor neto de mortalidad, tenemos que son A1M, B1M, B2M, B3M y D2M, las fracciones que no tuvieron efecto en el desarrollo de los nauplios de *Artemia*.

VI.6 ANALISIS TAXONOMICO.

VI.6.1 COLECCIÓN DE CIANOBACTERIAS MARINAS.

Las cepas de cianobacterias tanto marinas como de agua dulce que se lograron aislar, se encuentran preservadas en un Ultracongelador REVCO a -70°C , con lo que se dió inicio a la formación de la colección de cianobacterias regionales para el Laboratorio de Microbiología Molecular del Depto. de Biotecnología Marina (CICESE). Se cuentan con células viables en ampulas de 2 mL de muestras de cianobacterias y con biomasa liofilizada de las mismas (Anexo III). Existe un álbum con fotografías de cada una de las cepas de cianobacterias de esta colección, en donde se anexan las características siguientes: nombre científico, clave, lugar de colecta y sus características morfológicas, entre otras. En la Tabla VIII se presentan las características particulares de las cianobacterias aisladas en este trabajo.

Tabla VIII. Características de las cianobacterias que forman la Colección de cianobacterias del Laboratorio de Microbiología Molecular.

a) SEBC9908-2

Nombre científico	<i>Synechococcus elongatus</i> , Nageli, C. 1849
Clave	SEBC9908-2
Clase	Cyanophyceae
Orden	Chroococcales
Familia	Chroococaceae
Localización	Ensenada, B.C., México
Colección de procedencia	Depto. Biotecnología Marina (CICESE)
Aislamiento	Torres-Ariño, A. 1999
Características morfológicas	Unicelular, reproducción por fisión binaria en un sólo plano, células cilíndricas, solitarias o en cadenas de 2 a 4 células.
Salinidad	33-75 ‰
Temperatura de crecimiento	25°C
Medio de cultivo	ASNIII (Rippka <i>et al.</i> , 1979)
Otras características	Fuente: Aislada del manantial termal, Santispac, B.C.S., México. Estanque # 2 Ubicación en colección: 3 A, 4 A

b) PHBC9908

Nombre científico	<i>Phormidium</i> sp.
Clave	PHBC9908
Clase	Cyanophyceae
Orden	Oscillatoriales
Familia	Phormidiaceae
Localización	Ensenada, B.C., México
Colección de procedencia	Depto. Biotecnología Marina (CICESE)
Aislamiento	Torres-Ariño, A. 2000
Características morfológicas	Talo pequeño, vino, filamentos generalmente rectos. Vaina
Salinidad	33 ‰
Temperatura de crecimiento	21°C
Medio de cultivo	ASNIII (Rippka <i>et al.</i> , 1979)
Otras características	Fuente: Laguna de Santispac, B.C.S., México. Ubicación en colección: 10C, 1D

c) Sant21

Nombre científico	<i>Phormidium</i> sp. Posible <i>P. fragile</i> (Meneghini) Gomont
Clave	Sant21
Clase	Cyanophyceae
Orden	Oscillatoriales
Familia	Phormidiaceae
Localización	Ensenada, B.C., México
Colección de procedencia	Depto. Biotecnología Marina (CICESE)
Aislamiento	Torres-Ariño, A. 2000
Características morfológicas	Talo azul verde, tricoma más o menos flexible, con constricción. Vaina, 1.2-3 µm ancho, células cuadradas.
Salinidad	33 ‰
Temperatura de crecimiento	21°C
Medio de cultivo	ASNIII (Rippka <i>et al.</i> , 1979)
Otras características	Fuente: Laguna de Santispac, B.C.S., México. Ubicación en colección: 5C, 6C

d) UNIC9908

Nombre científico	<i>Aphanothece</i> sp.
Clave	UNIC9908
Clase	Cyanophyceae
Orden	Chroococcales
Familia	Chroococaceae
Localización	Ensenada, B.C., México.
Colección de procedencia	Depto. Biotecnología Marina (CICESE)
Aislamiento	Torres-Ariño, A. 1999
Características morfológicas	Unicelular, reproducción por fisión binaria en un sólo plano, células elipsoidales, rara vez casi cilíndricas. Células solitarias o en pares una tras otra.
Salinidad	33 ‰
Temperatura de crecimiento	25°C
Medio de cultivo	ASNIII (Rippka <i>et al.</i> , 1979)
Otras características	Fuente: Aislada de agua estancada, Santispac, B.C.S., México. Ubicación en colección: 5 A, 6 A

e) E6BC9808-6

Nombre científico	<i>Oscillatoria</i> sp. posible <i>O. amphigranulata</i>
Clave	E6BC9908-6
Clase	Cyanophyceae
Orden	Oscillatoriales
Familia	Pseudoanabaenaceae
Localización	Ensenada, B.C., México
Colección de procedencia	Depto. Biotecnología Marina (CICESE)
Aislamiento	Torres-Ariño, A. 1999
Características morfológicas	Tricomas rectos, móviles, sin constricciones. Células terminales sin reducción del diámetro.
Salinidad	33 ‰
Temperatura de crecimiento	25°C
Medio de cultivo	ASNIII (Rippka <i>et al.</i> , 1979)
Otras características	Fuente: Aislada de agua estancada, Santispac, BC.S., México. Ubicación en colección: 4B, 5B, 6B

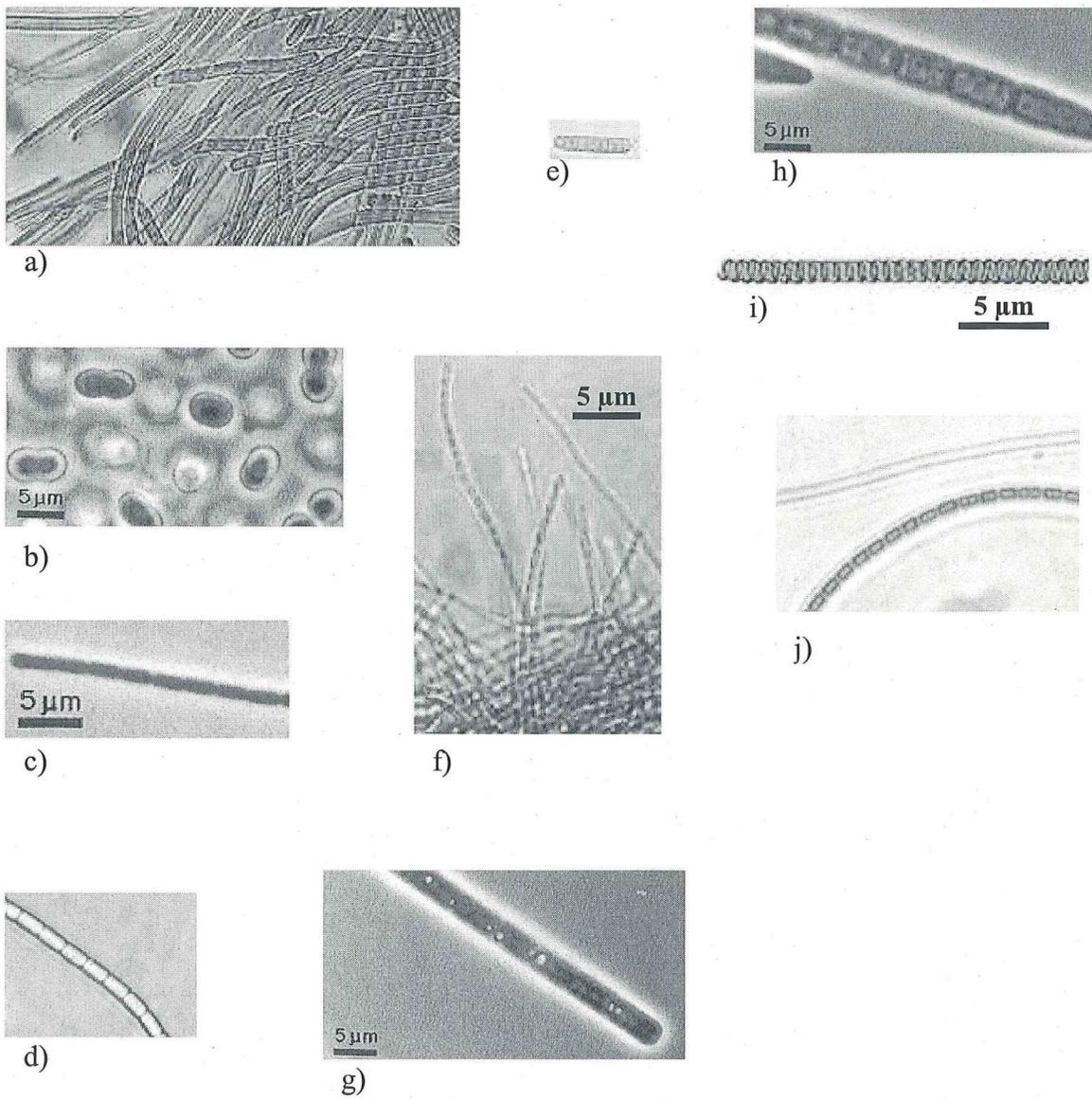


Figura 13. Cianobacterias marinas de los termales de Santispac, Bahía Concepción, B.C.S., México. a) *P. okeni*, b) *A. bullosa*, c) *P. rubrum*, d) *Phormidium* sp., e) Hormogonio de *P. okeni*, f) *P. rubrum*, g) *L. amphigranulata*, h) *M. chthonoplaste*, i) *Spirulina* sp. y j) *P. tenue*. Fotos: López-Cortés, A y Torres-Ariño, A.

f) E6GN9908-6

Nombre científico	<i>Oscillatoria</i> sp. posible <i>O. amphigranulata</i>
Clave	E6GN9908-6
Clase	Cyanophyceae
Orden	Oscillatoriales
Familia	Pseudoanabaenaceae
Localización	Ensenada, B.C., México
Colección de procedencia	Depto. Biotecnología Marina (CICESE)
Aislamiento	Torres-Ariño, A. 1999
Características morfológicas	Tricomas rectos, con movimiento, sin constricciones. Células terminales sin reducción del diámetro.
Salinidad	33 ‰
Temperatura de crecimiento	25-55°C
Medio de cultivo	ASNIII (Rippka <i>et al.</i> , 1979)
Otras características	Fuente: Tapetes microbianos de los vasos concentradores de sal (ESSA), Gro. Negro, BC.S., México. Ubicación en colección: 9D,10D

g) D2100EGA-5

Nombre científico	<i>Oscillatoria</i> sp.
Clave	D2100EGA-5
Clase	Cyanophyceae
Orden	Oscillatoriales
Familia	Oscillatoriaceae
Localización	Ensenada, B.C., México
Colección de procedencia	Depto. Biotecnología Marina (CICESE)
Aislamiento	Torres-Ariño, A. 1999
Características morfológicas	Tricomas rectos, con movimiento, sin constricciones. Células terminales sin reducción del diámetro y sin testera.
Salinidad	33 ‰
Temperatura de crecimiento	25 ± 2°C
Medio de cultivo	ASNIII (Rippka <i>et al.</i> , 1979)
Otras características	Aislada de capa superficial de Tapete microbiano. Fuente: Laguna Ojo de Liebre, Gro. Negro, B.C.S., México. Ubicación en colección: 8 A, 9 A, 10 A

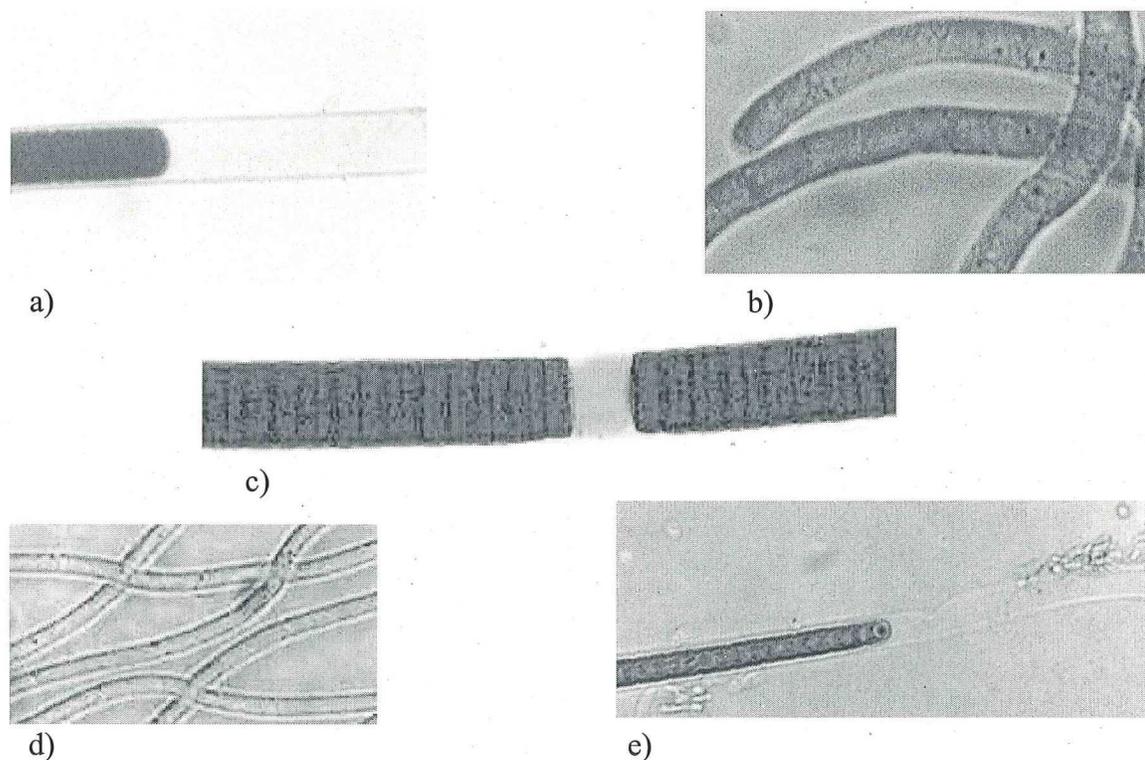


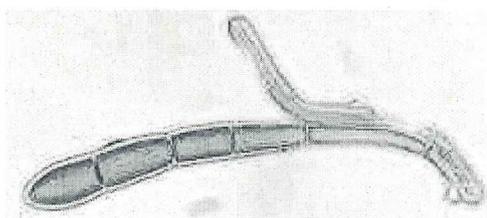
Figura 14. Cianobacterias de los vasos concentradores de sal de la Compañía Exportadora de Sal (ESSA). Gro. Negro, B.C.S., México. a) *Lyngbya* cf. *aestuarii*, b) posible *O. nigroviridis*, c) *Lyngbya* sp., d) *O. amphigranulata* y e) *Oscillatoria* sp. Foto: Torres-Ariño, A.

h) GEDA9910-I

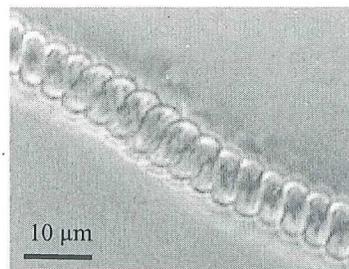
Nombre científico	<i>Phormidium</i> sp., <i>Lyngbya</i> sp., <i>Oscillatoria</i> sp., <i>Spirulina</i> sp.
Clave	GEDA9910-I
Clase	Cyanophyceae
Orden	Oscillatoriales
Familia	Oscillatoriaceae, Phormidiaceae
Localización	Ensenada, B.C., México
Colección de procedencia	Depto. Biotecnología Marina (CICESE)
Aislamiento	Torres-Ariño, A. 1999
Características morfológicas	Cianobacterias filamentosas , con constricciones, móviles.
Salinidad	33 ‰
Temperatura de crecimiento	21-25°C
Medio de cultivo	ASNIII (Rippka <i>et al.</i> , 1979)
Otras características	Fuente: Aisladas de concha de <i>M. galloprovincillis</i> . Rincón de Ballenas, B.C. Coloración vino para la primera y azul-verdosa las 3 últimas. Ubicación en colección: 10B, 1C Transferencias: GEDAI (2D, 3D) y GEDAI (6E, 7E, 8E)

i) GEDA9910-IV

Nombre científico	<i>Spirulina subsalsa</i>
Clave	GEDA9910-IV
Clase	Cyanophyceae
Orden	Oscillatoriales
Familia	Oscillatoriaceae
Localización	Ensenada, B.C., México
Colección de procedencia	Depto. Biotecnología Marina (CICESE)
Aislamiento	Torres-Ariño, A. 2000
Características morfológicas	Tricomas en espiral, con movimiento
Salinidad	33 ‰
Temperatura de crecimiento	21-25°C
Medio de cultivo	ASNIII (Rippka <i>et al.</i> , 1979)
Otras características	Fuente: Aisladas de concha de <i>M. galloprovincialis</i> . Rincón de Ballenas, B.C.
	Ubicación en colección: 3E, 4E, 8C, 9C



a)



b)

Figura 15. Cianobacterias del estanque de reproductores de *Mytilus galloprovincialis* de la empresa BGB Acuicultura. Punta Banda, B.C., México. a) *Calothrix* sp. y b) *Spirulina subsalsa*. Foto: Torres-Ariño, A.

j) PCC7942

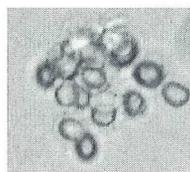
Nombre científico	<i>Synechococcus</i> sp.
Clave	PCC7942
Clase	Cyanophyceae
Orden	Chroococcales
Familia	Chroococaceae
Localización	Texas, U.S.A. y Ensenada, B.C., México.
Colección de procedencia	Universidad de Texas, U.S.A.
Aislamiento	Golden, 1998
Características morfológicas	Unicelular, reproducción por fisión binaria en un sólo plano, células cilíndricas, solitarias o en cadenas de 2 células.
Salinidad	0-33 ⁰ / ₀₀
Temperatura de crecimiento	25°C
Medio de cultivo	BG-11 y ASNIII (Rippka <i>et al.</i> , 1979)
Otras características	Ubicación en colección: 4J, 5J, 6J (BG-11) y 4D, 5D, 6D (ASNIII).

k) PCC6803

Nombre científico	<i>Synechocystis</i> sp.
Clave	PCC6803
Clase	Cyanophyceae
Orden	Chroococcales
Familia	Chroococaceae
Localización	Texas, U.S.A. y Ensenada, B.C., México.
Colección de procedencia	Universidad de Texas
Aislamiento	Golden, 1999
Características morfológicas	Unicelular, reproducción por fisión binaria en dos planos, células cilíndricas, solitarias.
Salinidad	0-33 ⁰ / ₀₀
Temperatura de crecimiento	25°C
Medio de cultivo	BG-11 y ASNIII (Rippka <i>et al.</i> , 1979)
Otras características	Única cianobacteria de la cual se tiene todo su genoma secuenciado. Ubicación en colección: 1J, 2J, 3J (BG-11) y 7C (ASNIII).



a)



b)

Figura 16. Cianobacterias de agua dulce, utilizadas en la estandarización de las técnicas moleculares y para la selección de la técnica de preservación. a) *Synechococcus* sp. PCC 7942 y b) *Synechocystis* sp. PCC 6803. Foto: Torres-Ariño, A.

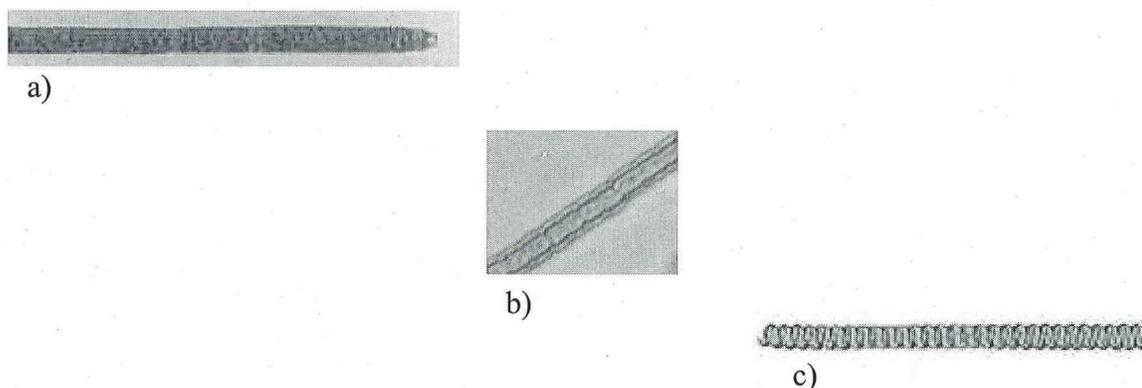


Figura 17. Cianobacterias de Polígonos de desecación del Brazo de San Quintín, B.C., México. a) *O. sancta*, b) posible *Phormidium* sp. y c) *S. subsalsa*. Foto: Torres-Ariño, A.

VI.6.1.1 Mantenimiento de los cultivos. A diferencia de las cepas bacterianas (incluimos aquí a *C. albicans*) que se preservan bien en glicerol, las cianobacterias se preservaron mejor en DMSO (5% v/v) ya que en glicerol hay proliferación de bacterias por la degradación de las células de cianobacterias.

Tabla IX. Características particulares de las cepas de cianobacterias utilizadas para la estandarización de las técnicas moleculares. (a) *S. elongatus*, (b) *P. rubrum*, (c) *P. okeni* y (d) *A. bullosa*.

1) *S. elongatus*

Nombre científico	<i>Synechococcus elongatus</i> , Nageli, C. 1849
Clave	SP2A9606-8
Clase	Cyanophyceae
Orden	Chroococcales
Familia	Chroococaceae
Localización	La Paz, B.C.S., México.
Colección de procedencia	CIBNOR
Aislamiento	López-Cortés, A.
Características morfológicas	Unicelulares, reproducción por fisión binaria en un plano, células cilíndricas, 1.4 a 2.0 μm de ancho hasta 5.0 μm de largo. Células solitarias o en cadenas de 2 a 4 células.
Salinidad	33-75 ‰
Temperatura de crecimiento	25°C
Medio de cultivo	ASNIII
Otras características	Fuente: Aislada del manantial termal, Santispac, B.C.S., México. Estanque # 2

m) *P. rubrum*

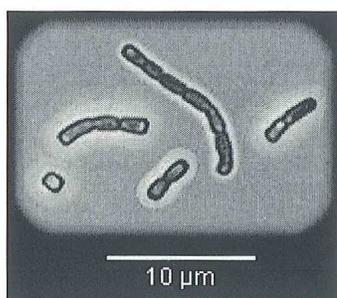
Nombre científico	<i>Phormidium rubrum</i> , Tilden, J. 1910
Clave	PCB9602-6
Clase	Cyanophyceae
Orden	Oscillatoriales
Familia	Phormidiaceae
Localización	La Paz, B.C.S., México
Colección de procedencia	CIBNOR
Aislamiento	López-Cortés, A.
Características morfológicas	Talo pequeño, escarlata. Filamentos generalmente rectos. Presencia de vaina. Células casi cuadradas y un poco largas de 1.0 μm de ancho.
Salinidad	33 ‰
Temperatura de crecimiento	21°C
Medio de cultivo	ASNIII
Otras características	Fuente: Sedimento calcáreo marino. Punta Cola de Ballena, El Coyote, B.C.S., México.

n) *P. okeni*⁽¹⁾

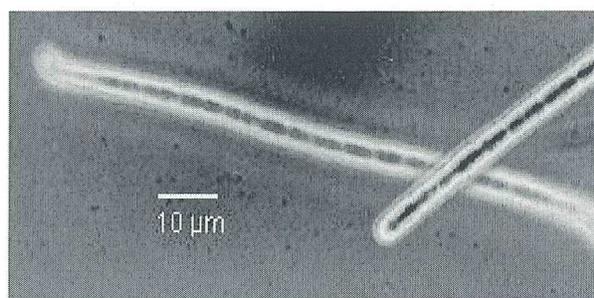
Nombre científico	<i>Phormidium okeni</i>
Clave	PCP2B9510-9
Clase	Cyanophyceae
Orden	Oscillatoriales
Familia	Phormidiaceae
Localización	La Paz, B.C.S., México
Colección de procedencia	CIBNOR
Aislamiento	López-Cortés, A.
Características morfológicas	Talo verde azul oscuro. Tricomas muy móviles, septada, de 5.5 a 7 μm de ancho. Generalmente células apicales con diámetro reducido.
Salinidad	33 ‰
Temperatura de crecimiento	25-55°C
Medio de cultivo	ASNIII
Otras características	Fuente: Tapetes microbianos, Posada Concepción, B.C.S., México. ⁽¹⁾ Cepa combinada con la cepa <i>P. rubrum</i>

ñ) *A. bullosa*

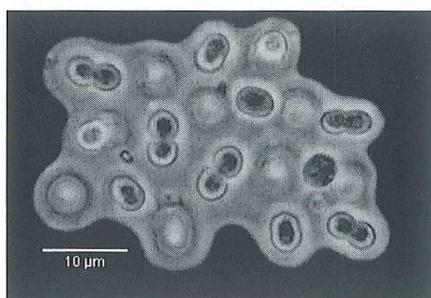
Nombre científico	<i>Aphanotece bullosa</i> , Sauvageau, C. 1892
Clave	SP2B9510-3
Clase	Cyanophyceae
Orden	Chroococcales
Familia	Chroococcaceae
Localización	La Paz, B.C.S, México
Colección de procedencia	CIBNOR
Aislamiento	López-Cortés, A.
Características morfológicas	Unicelulares, reproducción por fisión binaria, células elipsoidales, rara vez casi cilíndricas, 3-4 μm de ancho, hasta 5 μm de largo.
Salinidad	33 ‰
Temperatura de crecimiento	25-55°C
Medio de cultivo	ASNIII
Otras características	Fuente: cortezas de árboles y en aguas estancadas entre otras algas. Santispac, B.C.S., México.



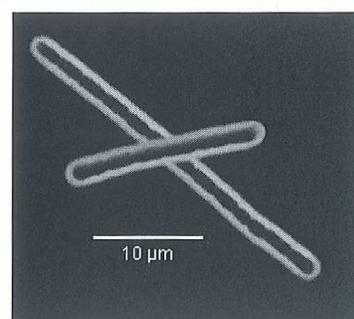
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 18. Cianobacterias marinas utilizadas en la estandarización de las técnicas moleculares. (a) *S. elongatus*, (b) *P. okeni*, (c) *A. bullosa* y (d) *P. rubrum*. Fotos: López-Cortés, A.

VI.7 ANALISIS MOLECULAR.

VI.7.1 Estandarización de los métodos moleculares. De los alineamientos realizados con secuencias depositadas en el banco de datos GenBank, se seleccionaron los oligonucleótidos RNAr 16S-univ y RNAr 23S-ciano, que permitieron la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S, la región intergénica (ITS) y el fragmento inicial del gen que codifica para el ARNr 23S (Figura 19). Además se diseñaron los oligonucleótidos: ciano16Sintrev (1270), ciano16Sintfor (1269), cianodIR (1268) y ciano16finfor (1267), los cuales permitirán la amplificación de dos regiones variables del gen que codifica para el ARNr 16S. Por otra parte, los oligos 1267 y el RNA23S-ciano, permitirán la amplificación de la Región Intergénica (Figura 19).

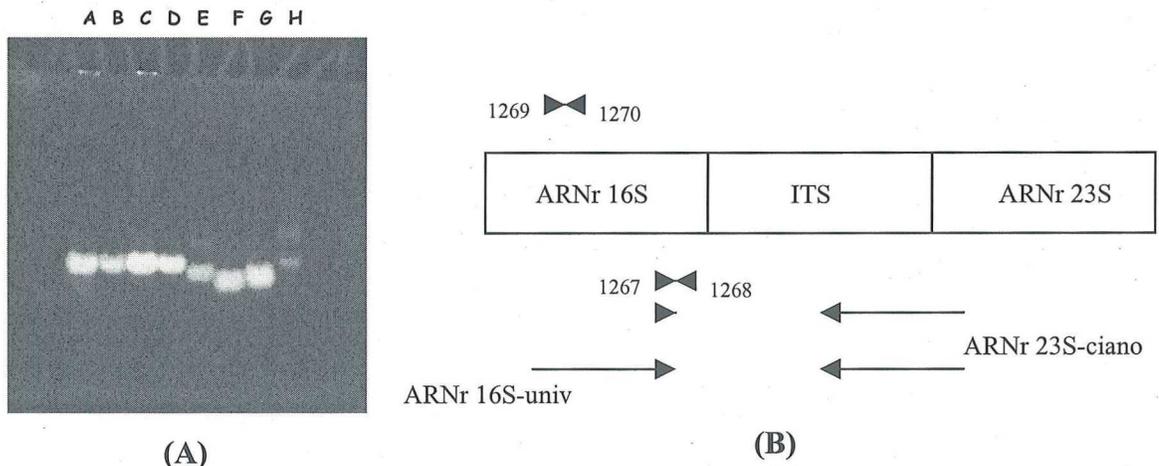


Figura 19. Oligos utilizados en la caracterización de cianobacterias. (A) Electroforesis en gel de poliacrilamida 0.7% de los oligos, Carril (A) 1267, (B) 1268, (C) 1269, (D) 1270, (E) ARNr 23S-ciano, (F) ciano-crudo, (G) ARNr 16S-univ y (H) univ-crudo. (B) Sitios de reconocimiento de los oligos utilizados para la amplificación del gen que codifica para el ARN ribosomal de cianobacterias.

Las cepas de cianobacterias provenientes de la colección del CIBNOR (Tabla IX, Figura 18), sirvieron para estandarizar los métodos moleculares. La amplificación del

fragmento 16S-ITS-23S sin previa extracción o purificación del ADN cromosomal (Figura 20) resultó sólo en algunos de los cultivos de cianobacterias.

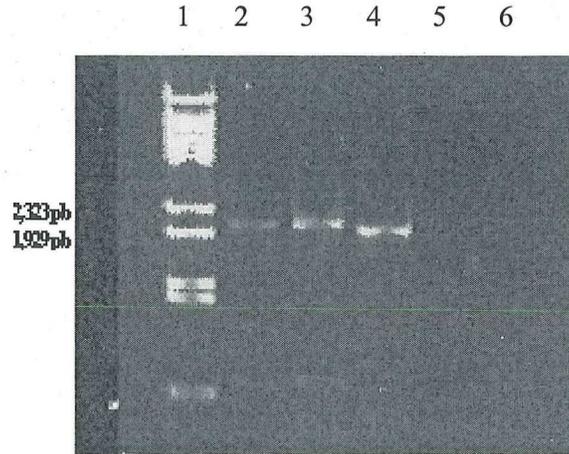


Figura 20. Fragmentos de ADN en gel de agarosa al 1.2%, obtenidos por PCR directamente de cultivos. Carril (1) Marcador BstEII, (2) *S. elongatus*, (3) *A. bullosa*, (4) *P. rubrum*, (5) *P. okeni* I y (6) *P. okeni* II.

De las cianobacterias, *P. okeni* I y *P. okeni* II no se obtuvo el fragmento esperado de 2,100 pb, por lo que fue necesario realizar la extracción de ADN cromosomal (Figura 21) para después realizar la amplificación (Figura 22), en donde se observan los fragmentos esperados de las cepas de cianobacterias que sin previa extracción no lo mostraban.

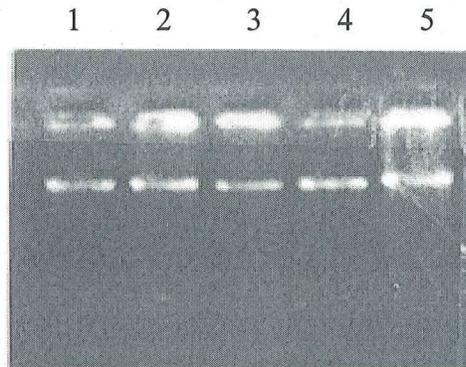


Figura 21. ADN cromosomal de cianobacterias marinas. Carril (1 y 2) *P. okeni* I, (3 y 4) *P. rubrum* y (5) *A. bullosa*.

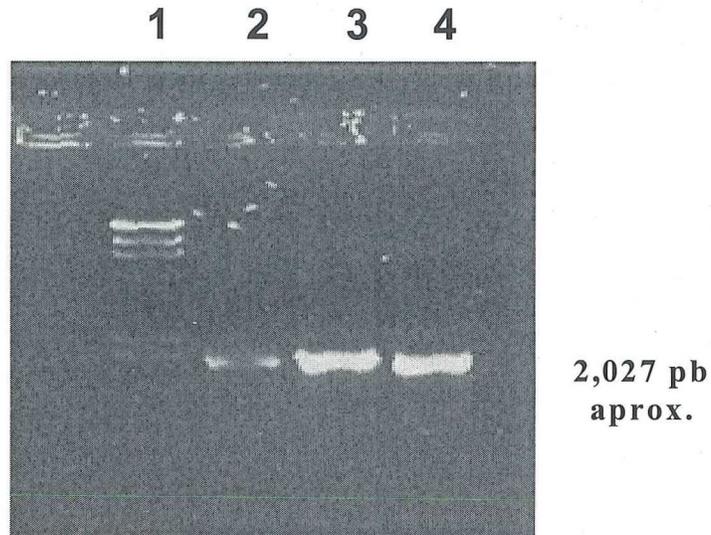


Figura 22. Amplificación del ADN ribosomal en gel de agarosa al 1.2%, obtenida por PCR previa extracción del ADN cromosomal. Carril (1) Marcador *Hind*I, (2) *P. okeni* I, (3) *A. bullosa* y (4) *P. rubrum*.

VI.7.2 Análisis de restricción teórico.

Después de realizar el análisis de restricción teórico con diversas secuencias de cianobacterias, representativas a los géneros aislados, se seleccionaron las enzimas: *Alu* I, *Dde* I, *Msp* I y *Tru9* I por presentar diferencias en el patrón de bandeo, es decir que se obtuvieron fragmentos de diferentes tamaños (Figura 23).

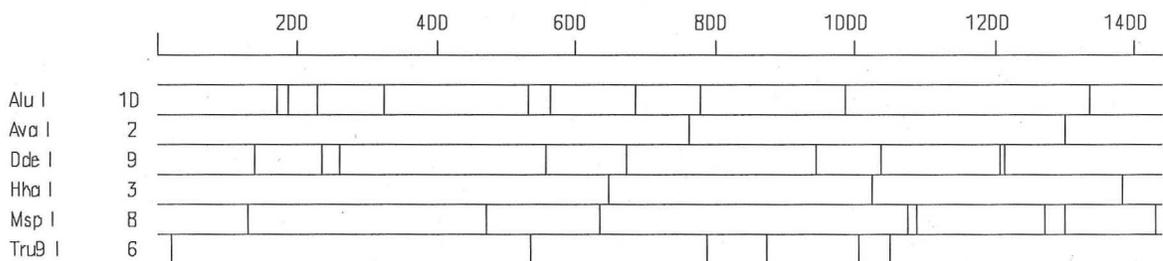


Figura 23. Ejemplo del análisis de restricción teórico con el gen que codifica para el ARNr 16S de *Spirulina subsalsa*.

VI.7.3 Análisis de restricción experimental.

En dicho análisis, no se observó diferencia alguna en el patrón de bandeo al digerir el producto de PCR (2,100 pb aprox) durante los diferentes tiempos utilizados, por lo que se seleccionó el de 1:30 h como el tiempo a utilizar en los ensayos de digestión. Como se observa en la figura 24, independientemente de la enzima utilizada para digerir el producto de PCR de la cepa 17bSQ, se obtuvieron cuatro fragmentos, aunque los tamaños variaron dependiendo de la enzima utilizada. Los tamaños de los fragmentos obtenidos para cada enzima fueron los siguientes: 100, 300, 800 y 900 pb (2,100 pb) con *Tru9* I; 100, 300, 650 y 700 pb (1750 pb) con *Msp* I; 100, 300, 400 y 500 pb (1300 pb) con *Dde* I y 100, 200, 350 y 500 pb (1150 pb) con *Alu* I. El valor que se muestra entre paréntesis indica la suma aproximada de los fragmentos, el cual debería de ser de igual tamaño que el producto de PCR.

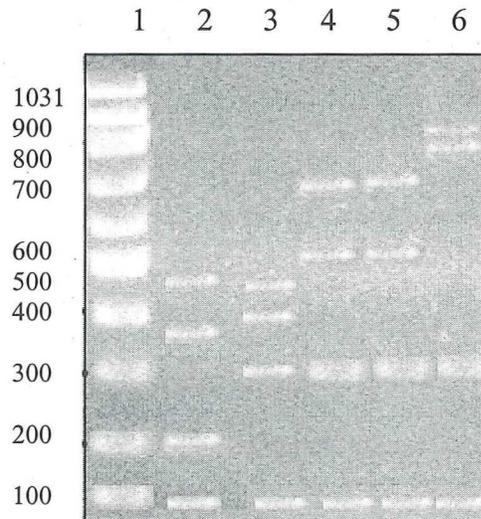


Figura 24. Patrón de bandeo de la cepa 17bSQ utilizada para la estandarización del análisis de restricción experimental. Carril 1) Marcador 100 bp ADN, 2) Enzima *Alu* I (1 h), 3) Enzima *Dde* I (1 h), 4) Enzima *Msp* I (1 h), 5) Enzima *Msp* I (3 h) y 6) *Tru9* I (1 h). Gel de agarosa al 2%, 1:30 h de corrimiento a 80 V.

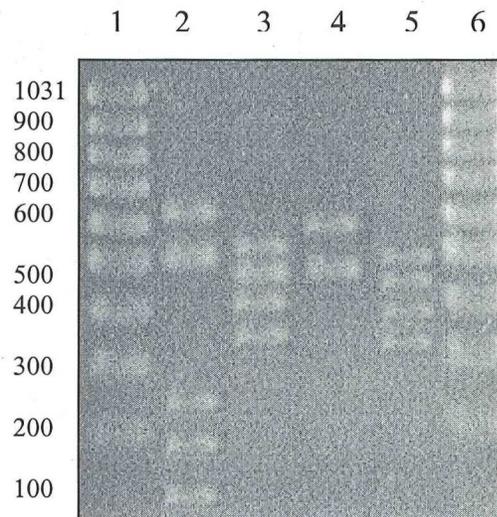


Figura 25. Fragmentos obtenidos de la digestión de productos de PCR. Carril 1) Marcador 100 bp ADN, 2) *P. okeni* I con *Msp* I, 3) *P. okeni* I con *Tru9* I, 4) *P. rubrum* con *Msp* I, 5) *P. rubrum* con *Tru9* I y 6) Marcador 100 bp ADN.

La Figura 25 muestra los fragmentos obtenidos de la digestión con las cepas *P. okeni* I y una cepa axénica de *P. rubrum* con las enzimas *Msp* I y *Tru9* I. Para *P. okeni* I se obtuvieron cinco fragmentos de 100, 200, 250, 500 y 650 pb (1700 pb) con *Msp* I y cuatro de 350, 400, 500 y 550 pb (1800 pb) con *Tru9* I. La cepa de *P. rubrum* mostró 2 fragmentos de 500 y 650 pb (1150 pb) con *Msp* I y cuatro de 350, 400, 500 y 550 pb (1800 pb) con *Tru9* I.

La primera cepa, según observación morfológica, está compuesta de dos especies de cianobacterias: *P. okeni* y *P. rubrum*. La segunda cepa, *P. rubrum*, es una cepa axénica que se ocupó como control. Si se observa el patrón de bandeo de ambas cepas, se tiene que el patrón de bandeo con la enzima *Msp* I y *Tru9* I es el mismo para ambas muestras, con lo que pudiéramos inferir que la muestra nombrada como *P. okeni* I efectivamente contiene a la cepa *P. rubrum*. Sin embargo, para la cepa de *P. okeni* I con la enzima *Msp* I, se observan tres fragmentos adicionales que pudieran pertenecer a la cepa *P. okeni*.

VII. DISCUSIÓN

VII.1 Aislamiento y eliminación de contaminantes biológicos.

Para el crecimiento de las cianobacterias estudiadas en este trabajo, se seleccionó el medio de cultivo ASNIII por cumplir con los requerimientos necesarios de sales minerales. En trabajos anteriores con muestras de cianobacterias aisladas de tapetes microbianos de los lugares de colecta, se observó la preferencia del medio ASNIII para el crecimiento de las cianobacterias aisladas (Rippka *et al.*, 1981; López-Cortés, 1990; Torres-Ariño, 1997). Cabe mencionar que existen otros medios para el crecimiento y aislamiento de las cianobacterias, y dentro de los más comunes están el BG-11 (con fuente de nitrógeno combinado) y el BG-11° (sin fuente de nitrógeno); éste último utilizado para el desarrollo de una amplia variedad de cianobacterias fijadoras de nitrógeno provenientes del suelo y dulceacuícolas (Allen, 1968). Waterbury y Stanier (1981) mencionan que el medio MN es útil para el crecimiento de cianobacterias marinas y a diferencia del medio ASNIII, está elaborado con agua de mar natural filtrada. Lo que se observó en este estudio fue que el medio de cultivo MN presentó tasas de crecimiento lento de las cianobacterias, de ahí que todos los cultivos se mantuvieron en ASNIII. Para el aislamiento de la cianobacteria *Spirulina* sp. se utilizó el medio SOT pero de igual manera se prefirió el medio ASNIII por presentar mejor tasa de crecimiento.

El aislamiento de las cianobacterias por la técnica de deslizamiento y fototactismo, característica conocida como fototaxis, la cual es una particularidad de los organismos constructores de tapetes microbianos laminados (Tovar, 1991), favoreció el deslizamiento de los tricomas de las cianobacterias filamentosas en medio sólido y líquido, y para el caso de las unicelulares, esto se favoreció en medio líquido. La técnica de dilución seriada y la

de vaciado en placa permitieron el aislamiento y la proliferación de cianobacterias unicelulares del género *Synechococcus* sp. En la técnica de vaciado en placa, esto se le atribuye a que algunas cianobacterias cocoidales poseen velocidades de crecimiento y mejor adaptación a altas temperaturas (Castenholz, 1988). A pesar de que en las muestras originales se observaron los géneros *Gleocapsa* sp., *Dermocapsa* sp., *Chroococcus* sp. y *Gleotheca* sp., no se obtuvo crecimiento de estos géneros en medio líquido y por el contrario en medio sólido al hacer la transferencia con capilares, las células se dañaron y había proliferación de bacterias heterótrofas y algunos bacilos Gram negativos. Allen (1952) sugiere que la falla del crecimiento de cianobacterias unicelulares en agar puede atribuirse al grado de sequedad de la superficie del agar. De esta manera, en un estudio realizado por Allen (1968), observó que la concentración de agar por encima de 1.5% actúa como inhibidor del crecimiento. En nuestro estudio se trabajó con concentraciones de 1, 1.2 y 1.8% de agar y aunque las dos primeras estuvieron por debajo del límite de tolerancia, no obtuvimos el aislamiento de las cianobacterias unicelulares arriba mencionadas ni tampoco cianobacterias filamentosas de los géneros *Nodularia* sp., *Nostoc* sp. y *Anabaena* sp., entre otros factores, probablemente, por no cumplir los requerimientos necesarios para su crecimiento.

El medio de cultivo y las condiciones de cultivo juegan papeles importantes en cualquier tipo de aislamiento, ya que dependiendo del tipo de medio, la preparación y las condiciones de incubación, se va a favorecer el crecimiento de una u otra cepa. Además de que dependiendo de las condiciones anteriores será la morfología de los organismos y el éxito del aislamiento de los mismos. El trabajo con cianobacterias es una tarea ardua y el tiempo que se emplea para obtener cultivos monoespecíficos y axénicos, contrasta con el

éxito obtenido en el aislamiento y purificación. Se han implementado varias estrategias para desarrollar métodos más eficientes en la purificación de cianobacterias contaminadas, uno de estos métodos se implementó en este trabajo como fue la separación mecánica con capilares y las transferencias continuas de las células y de los tricomas de cianobacterias. Otras involucran el uso de agentes químicos, como los antibióticos y algunos sustitutos orgánicos, los cuales son relativamente inocuos para las cianobacterias, pero no para los contaminantes bacterianos.

El uso de antibióticos en este trabajo como el imipenem se debió a que por ser un antibiótico de amplio espectro β -lactámico, inhibió la biosíntesis del peptidoglicano en bacterias y en comparación con otros antibióticos de la misma familia, es más efectivo en la eliminación de las bacterias heterótrofas. Otros antibióticos como la ampicilina y la penicilina G son menos efectivos (Hirsch, 1991), mientras que el uso de cefoxitina que es un derivado semisintético de la cefamicina C fue menos efectivo que el imipenem en un cultivo de *Oscillatoria* sp. Por su parte Torres-Ariño (1997) menciona efectos contrarios a Hirsch (1991) en la cianobacteria *Oscillatoria limnetica*, donde se obtuvo que el empleo de cefoxitina resultó efectivo y exposiciones prolongadas (24 h) al antibiótico imipenem mostró patrones de desintegración en sus tricomas.

Los cambios morfológicos que presentaron algunas de las cianobacterias se debieron a las condiciones de cultivo y a la manipulación de las células y tricomas. Las intensidades de luz superiores a los requerimientos de las mismas ocasionaron cambios de coloración de los cultivos. Aunque las cianobacterias se colectaron de sitios con altas intensidades luminosas, sobre ellas se encontró crecimiento de bacterias heterótrofas y fotosintéticas, las cuales les confirieron coloraciones rosa, roja y naranja a la superficie de

los tapetes, como se observó en la Curva de Manifestaciones del Campo Geotérmico de Mexicali, B.C., México. La coloración verde y café se debió a la presencia de algunas microalgas (principalmente diatomeas bentónicas). Jorgensen (1988) observó una coloración naranja en invierno por diatomeas. No hay que olvidar que los cambios en la coloración de algunas cianobacterias dominantes del tapete microbiano se deben a la presencia de pigmentos fotoprotectores como el β -caroteno y las ficobiliproteínas, en respuesta a cambios en las condiciones de iluminación, concentración de nutrimentos (Canto de Loura *et al.*, 1987; Toledo, 1990) y porcentaje de NaCl (Tovar, 1991). De igual manera, la escasez de nutrimentos propicia la aparición de sustancias de reserva, representadas como inclusiones claras y oscuras (Canto de Loura *et al.*, 1987).

VII.2 Actividad Antimicrobiana.

En la mayoría de los extractos de cianobacterias evaluados en este trabajo no se encontró actividad antimicrobiana. Una de las posibles causas para esta observación es la poca cantidad de biomasa usada en la extracción, lo que ocasionaría una baja concentración de principio activo en los extractos y fracciones finales. Si comparamos con el trabajo de Ishida *et al.* (1997), quienes detectaron actividad antibacteriana contra *S. aureus*, la cantidad de biomasa de *M. aeruginosa* utilizada por estos autores fue exageradamente alta (120 g) en relación a la cantidad de biomasa empleada en este trabajo (0.4 g). Sin embargo, existen estudios donde las cantidades de biomasa utilizada fueron menores que 1 gramo (Mason *et al.*, 1982; Patterson *et al.*, 1991) y donde estos autores encontraron actividad antibacteriana, aunque no en fracciones provenientes de cianobacterias. Por otro lado, también debe considerarse la capacidad del disolvente para extraer sustancias. En general, la selección de los disolventes utilizados en este trabajo para la extracción se debió a que se

ha reportado que el uso de la mezcla de $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1) es efectiva para extraer un amplio intervalo de metabolitos secundarios de naturaleza polar (Newbold *et al.*, 1999). Sin embargo, ninguno de los extractos de este estudio mostraron actividad antimicrobiana al obtenerse con la primera estrategia. Esto concuerda con lo obtenido por otros autores, quienes reportan ausencia de actividad antimicrobiana al utilizar metanol (Gupta y Shrivastava, 1965) y cloroformo (Miura *et al.*, 1993) como disolventes. No obstante con la segunda estrategia de extracción, se encontró actividad contra *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, siendo esta última con la que hasta el momento no existe otro trabajo donde hayan encontrado actividad antimicrobiana contra esta cepa. Cabe hacer mención que es el primer trabajo donde se utilizan tantas cepas como organismos prueba.

A pesar de los resultados encontrados, no se descarta la posibilidad de que las cianobacterias aisladas en este trabajo presenten algún tipo de actividad de interés biotecnológico, lo que podría lograrse empleando otros disolventes y cambiando las estrategias de extracción.

VII.3 Toxicidad de los extractos de cianobacterias.

El bioensayo con la *Artemia* es mencionado por algunos autores como un ensayo anticancerígeno. Sin embargo, este ensayo no es específico para la detección de compuestos anticancerígenos o para cualquier acción fisiológica, pero sí se presenta como un ensayo donde el grado de toxicidad reflejado en el porcentaje de mortalidad puede ser indicativo de la presencia o efecto de algún compuesto o metabolito. Existe también una correlación de que el 90% de las sustancias que han sido probadas en *Artemia* y que resultan tóxicas, han sido tóxicas e inhiben el crecimiento de líneas celulares de cáncer (McLaughlin, 1991).

Las fracciones resuspendidas en diclorometano se evaporaron a sequedad y se resuspendieron en agua de mar filtrada y pasada por luz UV, ya que al realizar los ensayos de toxicidad, este disolvente resultó tóxico. El metanol, por su parte, no resultó tóxico y un 5 % de este disolvente no mostró efecto en el desarrollo de los nauplios. Por tal motivo, las fracciones de metanol se dejaron resuspendidas en ese mismo disolvente. Además del blanco se trabajó con agua de mar como control para observar la vitalidad de los nauplios y así asegurar que no era la manipulación la que causó el efecto letal. En los bioensayos con diclorometano, tanto el control como el blanco presentaron porcentajes de mortalidad muy similares (3.45 y 3.43 %, respectivamente), lo que sugiere que la mortalidad ocasionada por el blanco pudo deberse al estado estresado de los organismos causado por la manipulación de los mismos al montar el bioensayo. Otra posible causa de la mortalidad de los nauplios en el control es el efecto causado por la evaporación del disolvente.

Las fracciones B, C, E y F mostraron actividad antimicrobiana con los extractos tanto de diclorometano y metanol en *K. pneumoniae* y sólo las fracciones E2M, G1M y G3M de metanol, mostraron actividad con *P. aeruginosa*. Sin embargo, sólo las fracciones de diclorometano FD y GD mostraron toxicidad en *Artemia*; al igual que las fracciones C1M, C2M, D1M, E1M, E2M, E3M, F1M, F2M, G1M, G2M y G3M de metanol.

En los espectros de absorción de las fracciones de metanol y diclorometano, se observó la formación de un hombro aproximadamente en los 275 y 280 nm, lo que dificulta precisar el tipo de compuestos que se encuentran en las fracciones analizadas. Aunque existe un trabajo con *M. aeruginosa* extraída con metanol donde encuentran que produce un undecapéptido cíclico (Kawaguchipectina B) con propiedad antibacteriana, el cual se sabe que produce un pico de absorbancia máxima en los 276 nm (Ishida *et al.*, 1997). Los picos

de absorción encontrados en las fracciones, muestran datos alentadores con respecto a la detección de las toxinas, ya que en general, éstas son detectadas entre los 200 y 360 nm. La microcistina-LR absorbe en los 238 nm (Watanabe *et al.*, 1988), mientras que la anatoxina (a) en los 227 nm (Carmichael *et al.*, 1990) y la cilindrospermopsina en los 262 nm (Carmichael, 1995). Con los espectros de absorción obtenidos, es posible relacionar la presencia de este hombro y la toxicidad mostrada contra *Artemia*. Con las fracciones FD y GD se obtuvieron los menores valores de absorbancia en este hombro y sin embargo fueron las únicas que presentaron toxicidad. Por otra parte, las fracciones BD, CD, ED y FD, presentaron un espectro similar y fueron las que mostraron actividad antimicrobiana. No obstante en las fracciones de metanol, se identificaron tres patrones de espectros, siendo A1M, A2M, B1M, B2M, B3M, C2M, D2M, E3M, F2M, G1M y G3M similares; aunque de éstas sólo G1M y G3M tuvieron actividad contra *P. aeruginosa* y todas las demás con excepción de A1M y A2M, presentaron actividad contra *K. pneumoniae*. En las fracciones B1M, C2M, E3M, F2M, G1M y G3M se presentó toxicidad. El segundo patrón fue el observado con las fracciones D1M, E1M y F1M, donde sólo la primera y la última presentaron actividad contra *K. pneumoniae*; E1M y F1M comparten la característica de presentar los porcentajes de mortalidad más altos y un pico en los 220 nm. En el tercer y último grupo, se encuentran las fracciones G2M y E2M, quienes presentaron un mismo porcentaje de mortalidad y no mostraron actividad antimicrobiana contra *K. pneumoniae*. No obstante, E2M presentó actividad contra *P. aeruginosa*. Por la naturaleza de los disolventes utilizados en la extracción, posiblemente se trate de moléculas polares. Dichas moléculas pudieron ser algunos péptidos, productos extracelulares, aminoácidos, lípidos, entre otras. Trabajos como el de Ben-Amotz y Avron (1983) mencionan que las

cianobacterias, por ser organismos halófilos y/o halotolerantes, producen metabolitos orgánicos como carbohidratos, polioles y algunos aminoácidos que intervienen en su mecanismo de osmoregulación; dichos procesos se han observado en *A. halophytica* y en *Synechococcus* sp. En cianobacterias se ha reconocido como el mayor regulador osmótico al compuesto Glucosilglicerol a diferencia del glicerol producido por microalgas. Quizás este compuesto le diera la particularidad a los extractos de disminuir su solubilidad, lo cual pudiera afectar de alguna manera la disponibilidad de algún compuesto necesario para el crecimiento del organismo a prueba o por otra parte no permitió que los extractos se difundieran sobre la superficie del agar. Asimismo, se ha encontrado en *M. aeruginosa* un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos no tiene propiedad antibacteriana pero sus propiedades químicas se asemejan a otros péptidos cíclicos.

Es importante evaluar la toxicidad de cualquier compuesto que se pretenda introducir como una estrategia terapéutica contra padecimientos humanos. En este sentido, las cianobacterias comenzaron a estudiarse por sus efectos tóxicos causados en animales (Carmichael, 1988) y los daños en la salud humana (Falconer, 1991). Las propiedades moleculares de las toxinas, incluyen péptidos, alcaloides, compuestos organofosforados y lipopolisacáridos (Carmichael, 1988).

VII.4 Caracterización de las cianobacterias.

La taxonomía de las cianobacterias es una disciplina variable y compleja. Dependiendo de las condiciones de cultivo es la morfología que se aprecia y ciertas características que en el medio natural las identificaba de uno u otro género, pueden perderse debido a las condiciones de cultivo. La identificación de las cianobacterias se ha llevado a cabo mediante la utilización de sus características taxonómicas. Sin embargo, el

empleo de las herramientas moleculares, tal como la Reacción en Cadena de la Polimerasa y los análisis de restricción con genes completos o secuencias parciales, han sido capaces de detectar e identificar microorganismos de poblaciones naturales complejas. La utilización de cianobacterias para la producción de metabolitos con interés biotecnológico va en aumento. No obstante, varias de las cepas en las colecciones de cultivo y en los mismos manuales utilizados para la clasificación de las mismas, están mal nombradas e incluso han surgido nombres innecesarios. Tal confusión de los nombres y especies hace que las comparaciones de los resultados de diferentes autores sea una tarea complicada. La razón de llevar a cabo este estudio fue para desarrollar una metodología alternativa para corroborar la identificación de los géneros y en algunos casos las especies de los organismos aislados en dicho estudio.

VII.5 Análisis molecular.

VII.5.1 Extracción de ADN cromosomal.

Algunas cianobacterias, principalmente las filamentosas, pero en general, todas aquéllas que contienen vaina rígida o gruesa, presentaron dificultad para llevar a cabo la lisis celular, lo cual se reflejó en la extracción de ADN cromosomal, posiblemente es necesario llevar a cabo un rompimiento celular para facilitar este paso. A tal efecto fue necesario modificar las concentraciones y cantidades de las enzimas Lisozima y Proteinasa K; así como la temperatura de incubación al estar presente la lisozima. En un inicio, se había considerado la omisión del paso de la extracción del ADN para este trabajo a fin de canalizar la amplificación del fragmento de interés directamente del cultivo, pero al observar que no se lograba la amplificación de algunas de las cepas de cianobacterias, fue necesario realizar la extracción del ADN con las modificaciones antes mencionadas.

Con lo que respecta al análisis de restricción realizado para este tipo de estudios es necesario que se trabaje con cepas axénicas debido a que cada especie tiene una secuencia única de ADN y, en caso de tener combinación de organismos, se podría obtener un patrón erróneo y dificultar así su caracterización. Por otro lado, algunas diferencias morfológicas entre organismos pudieran no aparecer a nivel del gen 16S, por lo que es necesario el análisis de otras secuencias más variables como la región intergénica o espaciadora existente entre los genes que codifican para las unidades ribosomales 16S y 23S. En este estudio se obtuvieron patrones de bandeo de tres cianobacterias y aunque los fragmentos obtenidos no alcanzaron el total de 2.1 kb, dichos fragmentos pueden dar un primer indicio de las diferencias o similitudes entre los patrones y entre los organismos evaluados. En el inicio de este trabajo se manejaron las cepas de *P. okeni* I y *P. okeni* II como diferentes, debido a que en la primera, se observaron dos morfologías diferentes: una de ellas identificada como *P. okeni* y la otra como *P. rubrum*. Faltaría realizar una digestión con la cepa axénica de *P. okeni* para confirmar lo anterior. Al realizar la sumatoria de los fragmentos de ADN obtenidos de la digestión, no concuerda con el tamaño aproximado del producto de PCR de 2,100 pb; lo anterior puede deberse a que los fragmentos menores a las 100 pb no son detectados en el gel y el cálculo del fragmento obtenido con respecto al marcador es aproximado. No obstante, este tipo de análisis no es suficiente para garantizar una identidad a nivel de especie (Fox *et al.* 1992), ya que para ello se requiere poder secuenciar fragmentos y compararlos contra el banco de genes existente. Aún así, en los principales bancos de genes se encuentran alrededor de 3612 secuencias parciales que codifican para el ARNr 16S y sólo 35 corresponden a la secuencia intergénica, por lo que no se garantiza que todas las secuencias que uno introduzca estén dentro del banco de genes

y se pueda llegar a identificar a nivel de especie. Si bien es cierto, estas herramientas de biología molecular han permitido clasificar e inferir en las relaciones filogenéticas más cercanas entre cepas de cianobacterias (Wilmotte *et al.*, 1992).

VII.6 Mantenimiento de los cultivos.

Los cultivos de cianobacterias fueron inicialmente mantenidos en agar. Sin embargo, a pesar de que esto es una práctica cotidiana, un número limitado de cianobacterias, particularmente las unicelulares, no sobreviven en la superficie del agar. Para este trabajo se decidió no emplear un método con subsecuentes transferencias para reducir el riesgo de la introducción de contaminación. Dos métodos se seleccionaron: liofilizados y preservación con Sulfóxido de dimetilo (DMSO) como criopreservador. Con los cultivos liofilizados no se obtienen buenas tasas de recuperación. No obstante, se deja ya preparado el material para subsecuentes o posteriores extracciones. El empleo de DMSO mostró ser una técnica satisfactoria para el mantenimiento de las cepas. La preservación en DMSO (Torres-Ariño, 1997) y en glicerol (Wolk, 1988) seguida del almacenamiento en nitrógeno líquido, permitió la recuperación del 91% de las cepas. La preservación de las cianobacterias en glicerol, no resultó satisfactoria, además de que se promovió la proliferación de bacterias. Wolk (1988) obtuvo que la preservación de cianobacterias filamentosas es satisfactoria al congelarlas en glicerol o en DMSO.

VIII. CONCLUSIONES

1. La separación mecánica con capilares combinada con las transferencias continuas de las células y tricomas, permitieron el aislamiento de cianobacterias filamentosas. Las técnicas de dilución seriada y vaciado en placa favorecieron la obtención de cianobacterias unicelulares.
2. Los géneros *Oscillatoria*, *Phormidium* y *Microcoleus* fueron los géneros de cianobacterias predominantes en los diferentes lugares muestreados a lo largo de La Península de Baja California, México.
3. Las bacterias heterótrofas y las pertenecientes al género *Bacillus*, se encuentran asociadas a las vainas de las cianobacterias, principalmente a aquellas de formas filamentosas.
4. Los Tapetes microbianos denominados como polígonos de desecación del Brazo de San Quintín, B.C., México, fueron descritos por primera vez.
5. Las bacterias Gram (-) como *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* fueron sensibles a los extractos de cianobacterias: *K. pneumoniae* fue sensible a fracciones de diclorometano y en mayor proporción a las de metanol; *P. aeruginosa* fue sensible sólo a fracciones de metanol.
6. La toxicidad de los extractos de cianobacterias en nauplios de *Artemia* se presentó tanto en extractos de diclorometano como de metanol.
7. Todas las fracciones tanto de diclorometano como de metanol que dieron actividad antimicrobiana y mostraron toxicidad en nauplios de *Artemia*, presentaron un hombro entre 276-280 nm.

8. En las cianobacterias unicelulares o filamentosas con vaina hialina fue posible la amplificación directa de los genes ribosomales a diferencia de las cianobacterias con vaina rígida que requirieron extracción previa del ADN cromosomal.
9. El rompimiento previo de las células, facilita los procedimientos de extracción del ADN cromosomal en cianobacterias con vaina rígida; asimismo pudiera facilitar la amplificación directa de los genes de interés.
10. La comparación de los análisis de restricción sugiere que la cepa nombrada como *P. okeni* I está constituida por las especies *P. okeni* y *P. rubrum*, como se observó con los métodos tradicionales de clasificación.
11. Con el aislamiento de los diferentes géneros de cianobacterias, se dio inicio a la Colección de cianobacterias marinas y de agua dulce del Lab. de Microbiología Molecular del Departamento de Biotecnología Marina del CICESE.

LITERATURA CITADA

- Allen, M.B. 1952. "The cultivation of Myxophyceae". Arch. Mikrobiol. 17:34-53 p.
- Allen, M.M. 1968. "Simple conditions of growth of unicellular blue-green algae on plates". J. Phycol. 4:1-4 p.
- Anagnostidis, K. y Komárek, J. 1985. "Modern approach to the classification system of cyanophytes I". Introduction. Arch. Hydrobiol. Suppl. 71 (1-2):291-302 p.
- Anagnostidis, K. y Komárek, J. 1988. "Modern approach to the classification system of cyanophytes III". Oscillatoriales. Arch. Hydrobiol. Suppl. 80 (3):327-472 p.
- Awramik, S. M. y Cloud, P. 1978. "Biogeologic Relationships of ancient stromatolites and modern analogues". En: Krumbein, W.E. (Ed.). Environmental and Geomicrobiology, Ann Harbor Science, Ann Harbor, Mich. 1:165-178 p.
- Beardsley, T. 1991. "The A team, vitamin A and its cousins are potent regulators of cells". Scientific American, 262:10-11 p.
- Ben-Amotz, A. y Avron, W. 1983. "Acumulation of metabolites by halotolerant algae and its biotechnological potential". Appl. Environ. Microbiol. 37: 95-119 p.
- Bender, J., J.R. Washington, B. Graves, P. Phillips y G. Abotsi. 1994. "Characterization of Metal-Binding biofloculants produced by the cyanobacterial component of mixed microbial mats". Appl. Environ. Microbiol. 60 (7):2311-2315 p.
- Bothe, H. 1982. "Motility and Taxes". En: N.G. Carr y B.A. Whitton (Eds.). "The Biology of Cyanobacteria". Bot. Monogr. Blackwell Sci. Publ., University of California Press, Berkley. 87-104 p.

- Canell, R.J.P., S.J. Kellam, A.M. Owsianka y J.M. Walker. 1988. "Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors". *Planta Med.* 54:10-14 p.
- Canto de Loura, I. , J.P. Dubacq y J.C. Thomas. 1987. "The effects of nitrogen deficiency on pigments and lipids of cyanobacteria". *Plant Physiol.* 88:838-843 p.
- Carté, B.K. 1996. "Biomedical potencial of Marine Natural Products". *BioScience.* 46 (4):271-286 p.
- Cardellina, J.H., F.J. Marner y R.E. Moore. 1979. "Seaweed dermatitis: structure of lyngbyatoxin A". *Science.* 204:193-195 p.
- Carmichael, W.W. 1986. "Algal toxins". En: J.A. Callow (Ed.). "Advances in Botanical Research". Academic Press, London. 47-101 p.
- Carmichael, W.W. 1988. "Freshwater cyanobacteria (blue-green algae) toxins". En: Ownby, C.L. y G.V. Odell (Eds.). "Natural Toxins: Characterization, Pharmacology and Therapeutics", Pergamon Press, oxford. 3-16 p.
- Carmichael, W.W. 1992. "Cyanobacterial secondary metabolites: the cyanotoxins". *J. Appl. Bacteriol.*, 72:445-459 p.
- Carmichael, W.W. 1995. "Cyanobacterial toxins". En: G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson y A.D. Cembella (Eds.). "Manual on Harmful Marine Microalgae". Intergovernmental Oceanographic Commission. 163-175 p.
- Carmichael, W.W., N.A. Mahmood y E.G. Hyde. 1990. "Natural toxins from cyanobacteria (Blue-Green Algae)". En: S. Hall y G. Strichartz (Eds.). "Marine toxins: Origin, structure and molecular pharmacology". American Chemical Society, USA. 377 pp.

- Castenholz, R.W. 1988. "Culturing methods for Cyanobacteria". *Methods in Enzimology*. 167:3-95 p.
- Chambers, H.F. y M.A. Sande. 1997. "Fármacos antimicrobianos: consideraciones generales". En: Hardman, J. G., L.E. Limbird, P. B. Molinoff, R.W. Ruddon y A. G. Gilman (Eds.). "Las bases farmacológicas de la terapéutica". McGraw-Hill Interamericana, Novena edición. 1996 pp.
- Ciferri, O., O.Y. Tiboni, A.M. Sanagelantoni. 1989. "The genetic manipulation of cyanobacteria and its potencial uses". En: R.C. Cresswell, T.A.V. Rees y N. Shah (Eds.). "Algal and cyanobacterial Biotechnology". Longman Scientific y Technical, Burnt Mill, Essex, 239-271 p.
- Cohen, Y. y Rosenberg, E. 1989. "Microbial Mats". American Society for Microbiology. Washington, D.C. 494 pp.
- Curtin, M. E. 1985. "Chemicals from the sea". *Biotechnology* January, 34-37 p.
- DeMott, W.R., Q-X. Zhang y W.W. Carmichael. 1991. "Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*". *Limnol. Oceanogr.* 36 (7):1346-1357 p.
- Desikachary, T.V. 1959. "Cyanophyta". Indian Council of Agricultural Research, New Delhi. 686 pp.
- deSilva, E.D., D.E. Williams, R.J. Andersen, H. Klix, C.F.B. Holmes y T.M. Allen. 1992. "Motuporin, a potent protein phosphatase inhibitor isolated from Papua New Guinea sponge *Theonella sswinhoei* Gray". *Tetrahedron Lett.* 33:1561-1564 p.
- Falconer, I.R. 1991. "Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria". *Environmental Toxicology and Water Quality.* 6:177-184 p.

- Fenical, W. 1993. "Chemical studies of marine bacteria: Developing a New Resource".
Chem. Rev. 93:1673-1683 p.
- Fenical, W. 1997. "New pharmaceuticals from marine organisms". TIBTECH. 15:339-341
p.
- Flores, E. y C.P. Wolk. 1986. "Production, by filamentous, nitrogen-fixing cyanobacteria,
of a bacteriocin and of other antibiotics that kill related strains". Arch. Microbiol.
145:215-219 p.
- Fox, G.E., J.D. Wisotzkey y Jr. P. Jurtshuk. 1992. "How close is close: 16S rRNA sequence
identity may not be sufficient to guarantee species identity". Int. J. Syst Bacteriol.
42:166-170 p.
- Fujii, K., K. Harada, M. Suzuki, F. Kondo, Y. Ikai, H. Oka, W.W. Carmichael y K.
Sivonen. 1996. "Ocurrence of novel cyclic peptides together with microcystins from
toxic cyanobacteria, *Anabaena* species". En: T. Yasumoto, Y. Oshima y Y. Fukuyo
(Eds.). "Harmful and Toxic Algal Blooms". Intergovernmental Oceanographic
Comission of UNESCO. 559-562 p.
- Fujiki, H., R. Matsushima, S. Yoshizawa, M. Suganuma, S. Nishiwaki y W.W. Carmichael.
1991. "Liver tumor promotion through the okadaic acid pathway, inhibition of
protein phosphatases 1 and 2 A". Proc. Am. Assoc. Cancer. Res. 32:157-163 p.
- Garson, M.J. 1993. "The biosynthesis of marine natural products". Chem. Rev. 93:1699-
1733 p.
- Geitler, V.L. 1925. "Cyanophyceae. Pascher's Susswasserflora". Fischer-Verlag. Jena.
12:1-450 p.

- Gerwick, W.H., C.H. Mrozek, M.F. Moghaddam y S.K. Agarwal. 1989. "Novel citotoxic peptides from tropical marine cyanobacterium *Hormothamnion enteromorphoides*. I. Discovery, isolation and initial chemical and biological characterization of the hormothamnins from wild and cultures material". 45 (2):115-211 p.
- Gerwick, W.H., P.J. Proteau y D.G. Nagle. 1994. "Structure of curacin A, a novel antimiotic, antiproliferative and brine shrimp toxic natural product from marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*". J. Org. Chem. 59:1243-1245 p.
- Golubic, S. 1976. "Organisms that built Stromatolites. In: Walter, M.R. (Ed.) Stromatolites. Elsevier Scientific Publishing Company, N.Y. 113-126 p.
- Gupta, A.B. y G.C. Shrivastava. 1965. "On antibiotic properties of some fresh water algae". Hydrobiologia. 25:285-288 p.
- Hardman, J. G., L.E. Limbird, P. B. Molinoff, R.W. Ruddon y A. G. Gilman. 1997. "Las bases farmacológicas de la terapéutica". McGraw-Hill Interamericana, Novena edición. 1996 pp.
- Harrigan, G.G., H. Luesch, W.Y. Yoshida, R.E. Moore, D.G. Nagle, V.J. Paul, S.L. Mooberry, T.H. Corbett y F.A. Valeriote. 1998. "Symplostatin 1: A Dolastatin 10 analogue from the marine cyanobacterium *Symploca hydroides*". J. Nat. Prod. 98:321-328 p.
- Hirsch, C.F. 1991. "Method for isolation and purification of cyanobacteria". Appl. Environ. Microbiol. 37 (5): 1448-1452 p.
- Hoffmann, L. 1988. "Criteria for the classification of blue-green algae cyanobacteria at the genus and at the species level". Arch. Hydrobiol. Suppl. 80 (1-4):131-139 p.

- Ichikawa, T. y M. Date. 1971. "Improvement of kasugamycin-producing strain by the piece method and the prototroph method". *Folia Microbiol.* 16:218-224 p.
- Ishida, K., H. Matsuda, M. Murakami y K. Yamaguchi. 1997. "Micropeptins 478-A and B, Plasmin inhibitos from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*". *J. Nat. Prod.* 60:184-187 p.
- Jaramillo, V.E.L. 1996. "Resistencia bacteriana a los antibióticos en la Unidad de Cuidados Intensivos, Hospital de Caldas, 1992-1994". *Colombia Médica.* 27:66-68 p.
- Javor, B.J. y R.W. Castenholz. 1981. "Laminated microbial mats, Laguna Guerrero Negro, Mexico". *Geomicrobiol. J.* 2:237-273 p.
- Javor, B.J. y R.W. Castenholz. 1984. "Productivity studies of microbial mats, Laguna Guerrero Negro, Mexico". En: Y. Cohen, R.W. Castenholz y H.O. Halvorson (Eds.). "Microbial Mats: stromatolites". Alan R. Liss, Inc., New York. 149-170 p.
- Jawetz, E., L.M. Joseph y E.A. Adelberg. 1987. "Manual de microbiología médica". 5ª edición. México. El Manual Moderno. 1973 pp.
- Jones, A.G., C.M. Ewing y M.V. Melvin. 1981. "Biotechnology of solar salt fields". *Hydrobiologia.* 82:391-406 p.
- Jorgensen, B.B. 1989. "Light penetration, absorption, and action spectra in cyanobacterial mats". En: Cohen, Y. y E. Rosenberg (Eds.). "Microbial mats: physiological ecology of benthic microbial communities". American Society for Microbiology, Washington, D.C. 123-137 p.
- Koehn, F.E., R.E. Longley y J.K. Reed. 1992. "Microcolins A and B, new immunosuppressive peptides from the blue-green algae *Lyngbya majuscula*". *J. Nat. Prod.* 55:613-619 p.

- Kuhlemeier, C.J., V.J.P. Teeuwsen, M.J.T. Janssen y G.A. van Arkel. 1984. "Cloning of a third nitrate reductase gene from the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2 using a shuttle cosmid library". *Gene*. 31:109-116 p.
- López-Cortés, A., L. Margulis y J. Stolz. 1984. "Las comunidades microbianas estratificadas de Baja California Norte". *Ciencia y Desarrollo*. 59:45-52 p.
- López-Cortés, A. 1990. "Microbial mats in tidal channels at San Carlos, Baja California Sur, Mexico". *Geomicrobiol. J.* 8:69-85 p.
- López-Cortés, A. y D. Tovar. 1992. "Population changes in cyanobacterial mats and the role of NaCl on β -Carotene production in *Microcoleus* Strain SC7B9002-1". *Geomicrobiol. J.* 10:115-123 p.
- López-Cortés, A., J-L. Ochoa y R. Vazquez-Duhalt. 1994. "Participation of Halobacteria in crystal formation and the crystallization rate of NaCl". *Geomicrobiol. J.* 12:69-80 p.
- Margulis, I., B.D.D. Grosovsky, J.F. Stolz, E.J. Gong-Collins, S. Lenk, D. Read y A. López-Cortés. 1983. "Distinctive microbial structures and the pre-Phanerozoic fossil record". *Precambrian Res.* 20:443-477 p.
- Marquez F., K. Sasaki, N. Nishio y S. Nagai. 1995. "Enhancement of biomass and pigment production during growth of *Spirulina platensis* in mixotrophic culture". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 62:159-164 p.
- Mason, C.P., K.R. Edwards, R.E. Carlson, J. Pignatello, F.K. Gleason y J.M. Wood. 1982. "Isolation of Chlorine-containing antibiotic from the freshwater cyanobacterium *Scytonema hofmanni*". *Science* 215:400-402 p.
- McLaughlin, J.L. 1991. "Crown Gall Tumors on Potato Discs and Brine Shrimp Lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation". En: K.

- Hostettmann (Ed.). "Methods of Plant Biochemistry". Academic Press, London. 6: 1-33 p.
- Miura, Y., K. Sode, Y. Narasaki y T. Matsunaga. 1993. "Light-induced antimicrobial activity of extracts from marine *Chlorella*". J. Marine Biotechnology. 138-141 p.
- Mitsui, A. 1979. "Biological and biochemical hydrogen photoproduction". En: Ohta, T. (Ed.). pergamon Press, Oxford and New york. 171-191 p.
- Newbold, R.W, P.R. Jensen, W. Fenical, J.R. Pawlik. 1999. "Antimicrobial activity of Caribbean sponge extracts". Aquatic Microbial Ecology. 19:279-284 p.
- Nishiwaki-Matsushima, R., T. Ohta, S. Nishiwaki, M. Suganuma, K. Kohyama, T. Ishikawa, W.W. Carmichael y H. Fujiki. 1991. "Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR". J. Cancer Res. Clin. Oncol. 118:420-424 p.
- Okino, T., S. Qi, H. Matsuda, M. murakami y K. Yamaguchi. 1997. "Nostopeptins A and B, Elastase inhibitors from the cyanobacterium *Nostoc minutum*". J. Nat. Prod. 60:158-161 p.
- Papendorf, O., G.M. Köning y A.D. Wright. 1998. "hierridin B and 2,4-Dimethoxy-6-heptadecyl-phenol, secondary metabolites from the cyanobacterium *Phormidium ectocarpi* with antiplasmodial activity". Phytochemistry. 49 (8):2383-2386 p.
- Patterson, G.M., C.L. Baldwin, C.M. Bolis, F.R. Caplan, H. Karuso, L.K. Larsen, I.A. Levine, R.E. Moore, C.S. Nelson, K.D. Tschappat, G.D. Tuang, E. Furusawa, S. Furusawa, T.R. Norton y R.B. Raybourne. 1991. "Antineoplastic activity of cultures blue-green algae (Cyanophyta)". J. Phycol. 27:530-536 p.

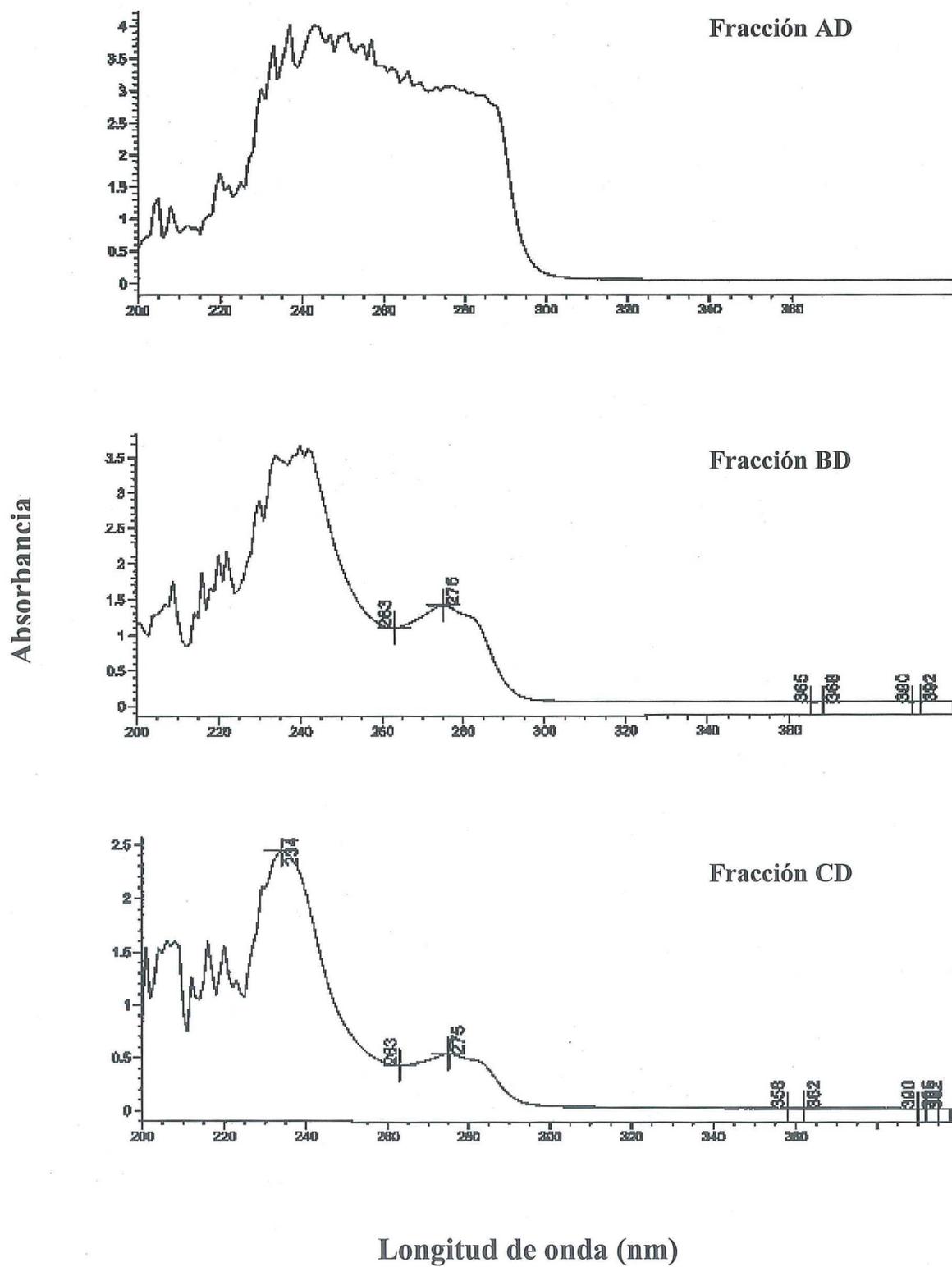
- Patterson, G.M. 1996. "Biotechnological applications of Cyanobacteria". J. Sci & Industrial Research. 55:669-684 p.
- Pasteur, L. y J. Joubert. 1877. "Charbone et septicémie". C.R. Acad. Sci. 85:101-115 p.
- Pentecost, A. 1984. "Effects of sedimentation and light intensity on mat-forming Oscillatoriaceae with particular reference to *Microcoleus lyngbyaceus* Gomont". J. Gen. Microbiol. 130:983-990 p.
- Reinhart, K.L., M. Namikoshi y B.W. Choi. 1994. "Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria)". J. Appl. Phycol. 6:159-176 p.
- Reinhart, K.L., P.D. Jr. Shaw, L.S. Shield, J.B. Gloer, G.C. Harbour, M.E.S. Koker, D. Samain, R.E. Schwartz, A.A. Tymiak, D.L. Weller, G.T. Carter, M.H.G. Munro, R.G. Hughes, H.E. Jr. Renia, E.B. Swynenberg, D.A. Stringfellow, J.J. Vava, J.H. Coats, G.E. Zurenko, S.L. Kuentzel, L.H. Li, G.J. Bakus, R.C. Brunca, L.L. Craft, D.N. Young y J.L. Conner. 1981. "Marine natural Products as sources of antiviral, antimicrobial, and antineoplastic agents". Pure Appl. Chem. 53:795-817 p.
- Richmond, A. 1986. "Handbook of microalgal mass culture". CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Rippka, R., J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman y R.Y. Stanier. 1979. "Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria". J. Gen. Microbiol. 111:1-61 p.
- Rippka, R., J.B. Waterbury y R.Y. Stanier. 1981. "Isolation and purification of cyanobacteria: some general principles". En: Starr, P., P. Stol, H. Trüpper, A. Balows, H. Schegel (Eds.). The prokaryotes a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. 212-220 p.

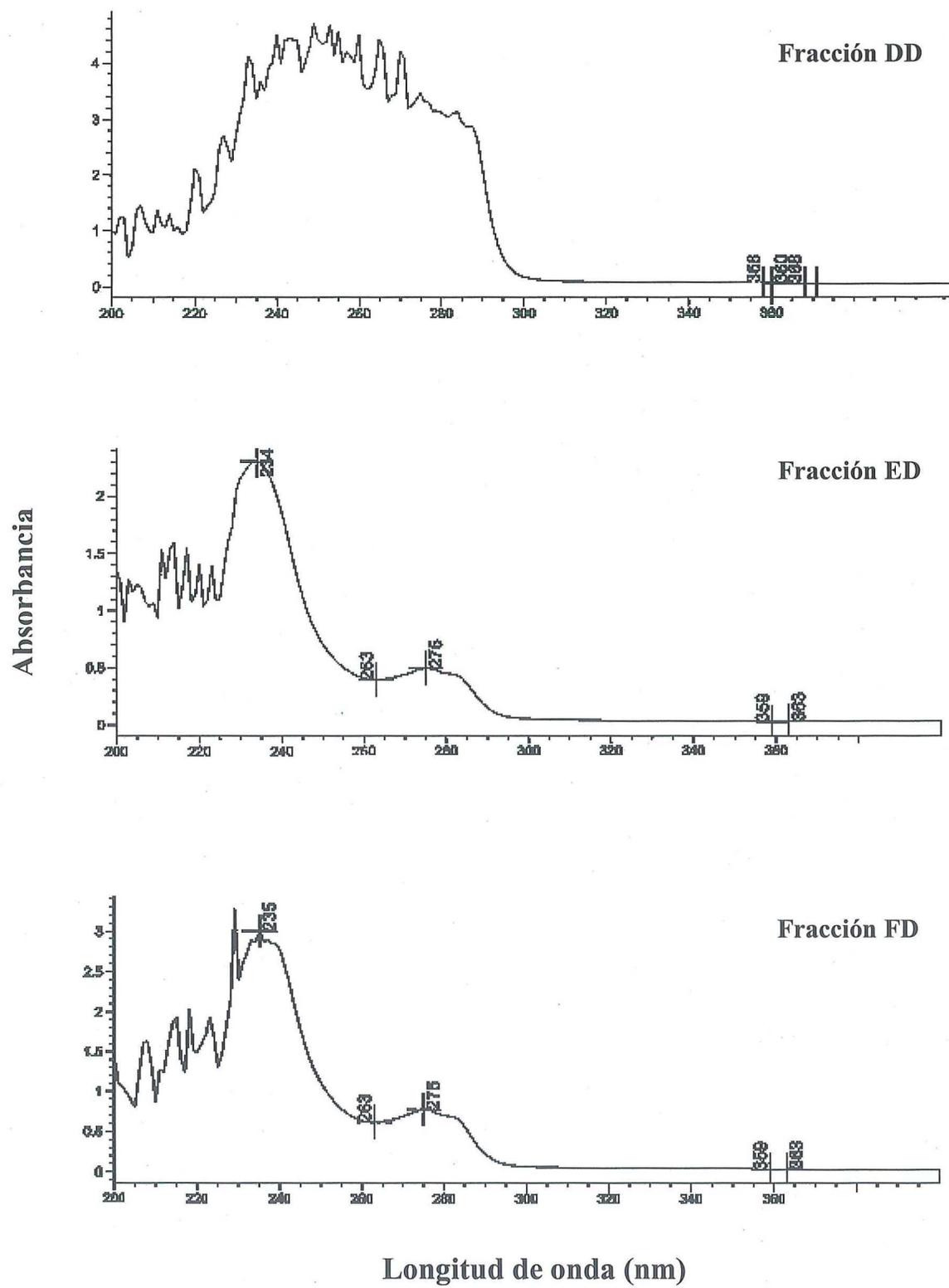
- Rippka, R. 1988. "Isolation and Purification of Cyanobacteria". *Methods in Enzymology*. 167:3-27 p.
- Rodríguez-López, M. 1983. "Microalgae: Their structural organization, uses and applications". *Process Biochemistry*. 21-27 p.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. "Molecular cloning. A laboratory manual". Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Tomo III, New York, USA.
- Schwartz, R.E., C.F. Hirsch, D.F. Sesin, J.E. Flor, M. Chartrain, R.E. Fromtling, G.H. Harris, M.J. Salvatore, J.M. Liesch y K. Yudin. 1990. "Pharmaceuticals from cultures algae". *J. Ind. Microbiol.* 5:113-124 p.
- Shimizu, Y. 1993. "Microalgal metabolites". *Chem. Rev.* 93:1685-1689 p.
- Shin, H.J., H. Matsuda, M. murakami y K. Yamaguchi. 1997. "Anabaenopeptins E and F, two new cyclic peptides from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* (NIES-204)". *J. Nat. Prod.* 60:139-141 p.
- Schneider, J. Y A.G. Hermann. 1980. "Saltworks-natural laboratories for microbiological and geochemical investigations during the evaporation of seawater". En: A.H., Coogan y Y.L. Hauder (Eds.). "5th international symposium on salt. Northern Ohio". *Geol. Soc. Ohio.* 155-162 p.
- Stanier, R., Y. Cohen-Brazire. 1977. "Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria". *Ann. Rev. Microbiol.* 31:225-274 p.
- Stal, L. y W. E. Krumbein. 1985. "Isolation and characterization of cyanobacteria from a marine microbial mat". *Botanica Marina*, 18:295-306 p.

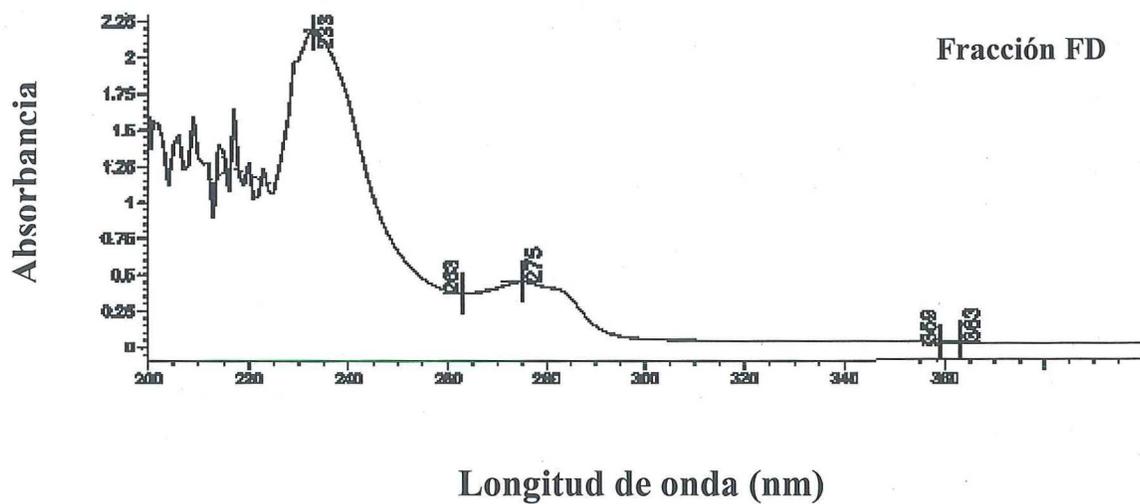
- Stolz, J.F. 1983. "Fine structure of the stratified microbial community at Laguna Figueroa, Baja California, Mexico. I. Methods of in situ study of laminated sediments". *Precambrian Res.* 20:479-492 p.
- Thiel, T., J. Bramble y S. Roger. 1989. "Optimum conditions for growth of cyanobacteria on solid media". *FEMS Microbiol. Let.* 27-32 p.
- Toledo, G.G. 1990. "Evaluación del crecimiento y producción de ficobiliproteínas de *Pseudoanabaena* (oscillatoriaceae: cyanobacteria) cepa SC7B8903". Tesis de Licenciatura. UABCS, La Paz, B.C.S., México. 118 pp.
- Torres-Ariño, A. 1997. "Retiro de cobre por cianobacterias marinas de tapetes microbianos: *Oscillatoria limnetica* y *Limnothrix amphigranulata*". Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Metropolitana – unidad Xochimilco, México. 62 pp.
- Tovar, R.D. 1991. "Aislamiento y caracterización de *Microcoleus* (Oscillatoriaceae: cyanobacteria) de los tapetes microbianos de los canales de marea de San Carlos, B.C.S., México". Tesis de Licenciatura, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México. 120 pp.
- Watanabe, M.F. y S. Oishi. 1985. "Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions". *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1342-1344 p.
- Watanabe, M.F., S. Oishi, K. Harada, K. Matura, H. Kawai y m. Suzuki. 1988. "Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (blue-green algae)". *Toxicon.* 26:1017:1025 p.
- Waterbury, J. y R. Stanier. 1981. "Isolation and growth of cyanobacterial from marine and hypersaline environments". En: Starr, M., P. Stol, H. Trüpper, A. Balows y H.

- Schegel (Eds.). The prokaryotes a handbook on habitats, isolation and identification of cyanobacteria. 220-223 p.
- Wilmotte, A., S. Turner, Y. Van de Peer y N.R. Pace. 1992. "Taxonomic study of marine Oscillatoriacean strains (Cyanobacteria) with narrow trichomes. II. Nucleotide secuencia analysis of the 16S ribosomal RNA". J. Phycol. 28:828-838 p.
- Wilmotte, A., G. Van der Auwera y R. De Wachter. 1993. "Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastiglocadus laminosus* HTF) strain PCC7518 and phylogenetic analysis". FEBS. 317 (1-2):96-100 p.
- Wolk, C.P. 1988. "Purification and storage of nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria". En: Patterson, G.M., C.L. Baldwin, C.M. Bolis, F.R. Caplan, H. Karuso, L.K. Larsen, I.A. Levine, R.E. Moore, C.S. Nelson, K.D. Tschappat, G.D. Tuang, E. Furusawa, S. Furusawa, T.R. Norton y R.B. Raybourne. 1991. "Antineoplastic activity of cultures blue-green algae (Cyanophyta)". J. Phycol. 27:530-536 p.

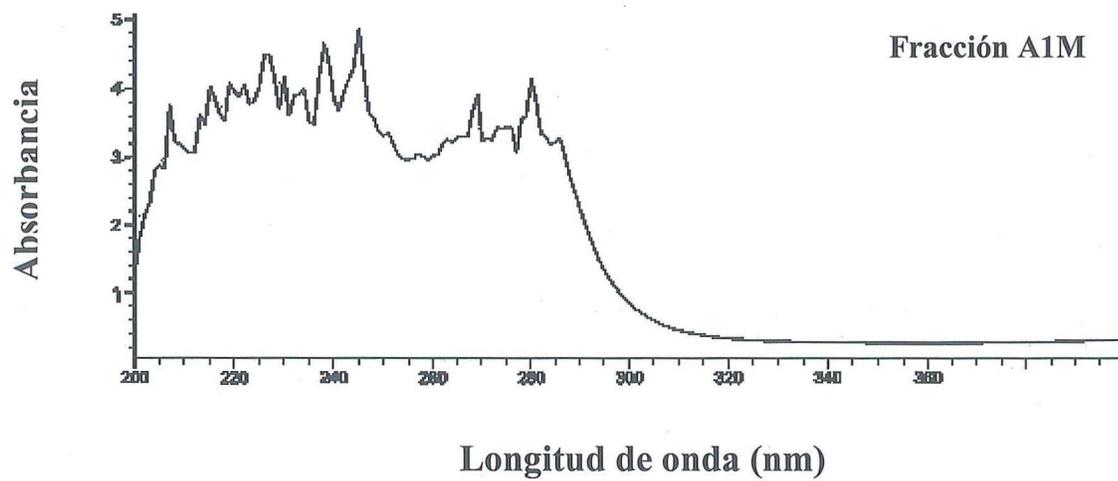
ANEXO I. Picos de absorción en la región ultravioleta (200-400 nm) de las fracciones de Diclorometano (D). Ver Tabla III para referencia de las cepas.

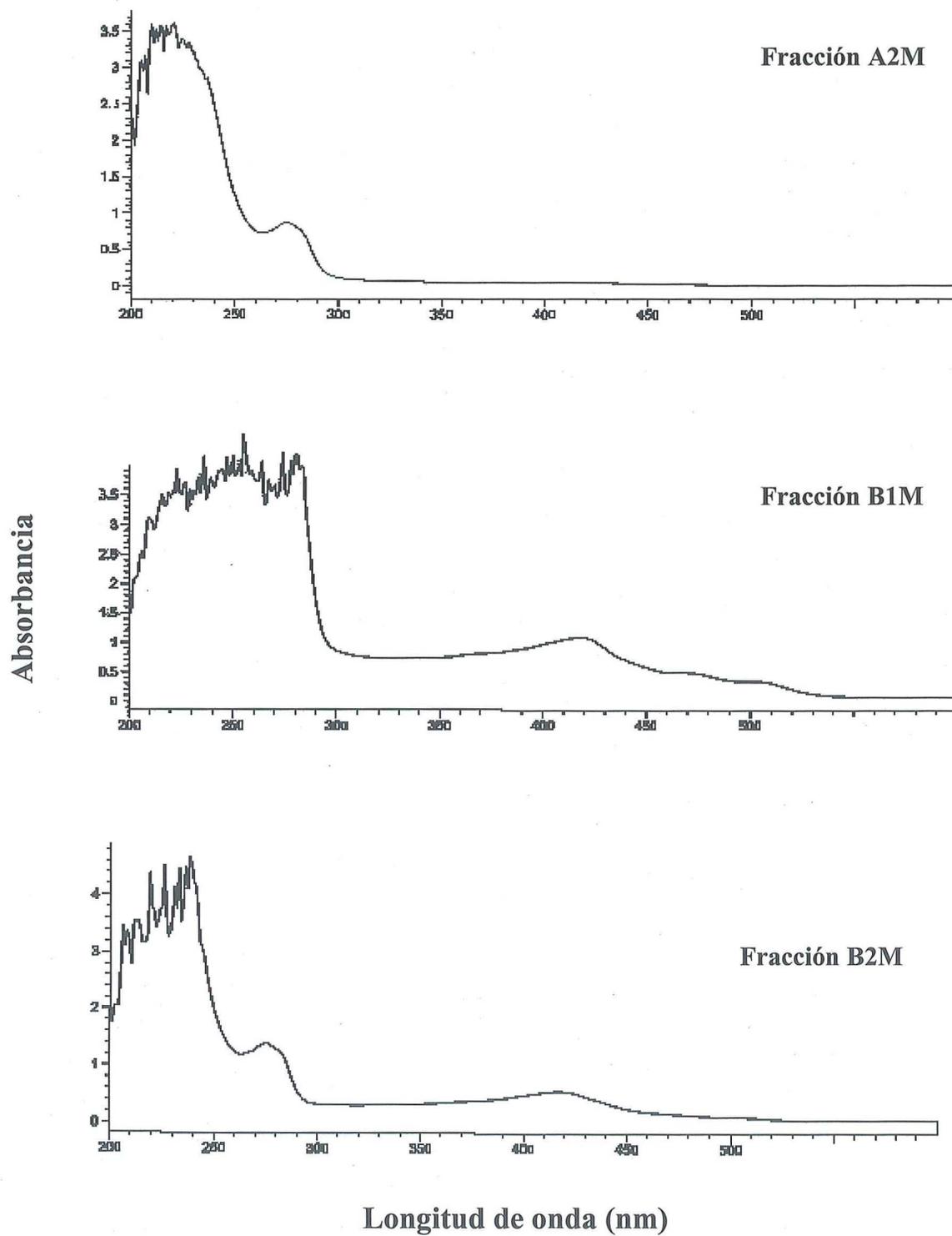


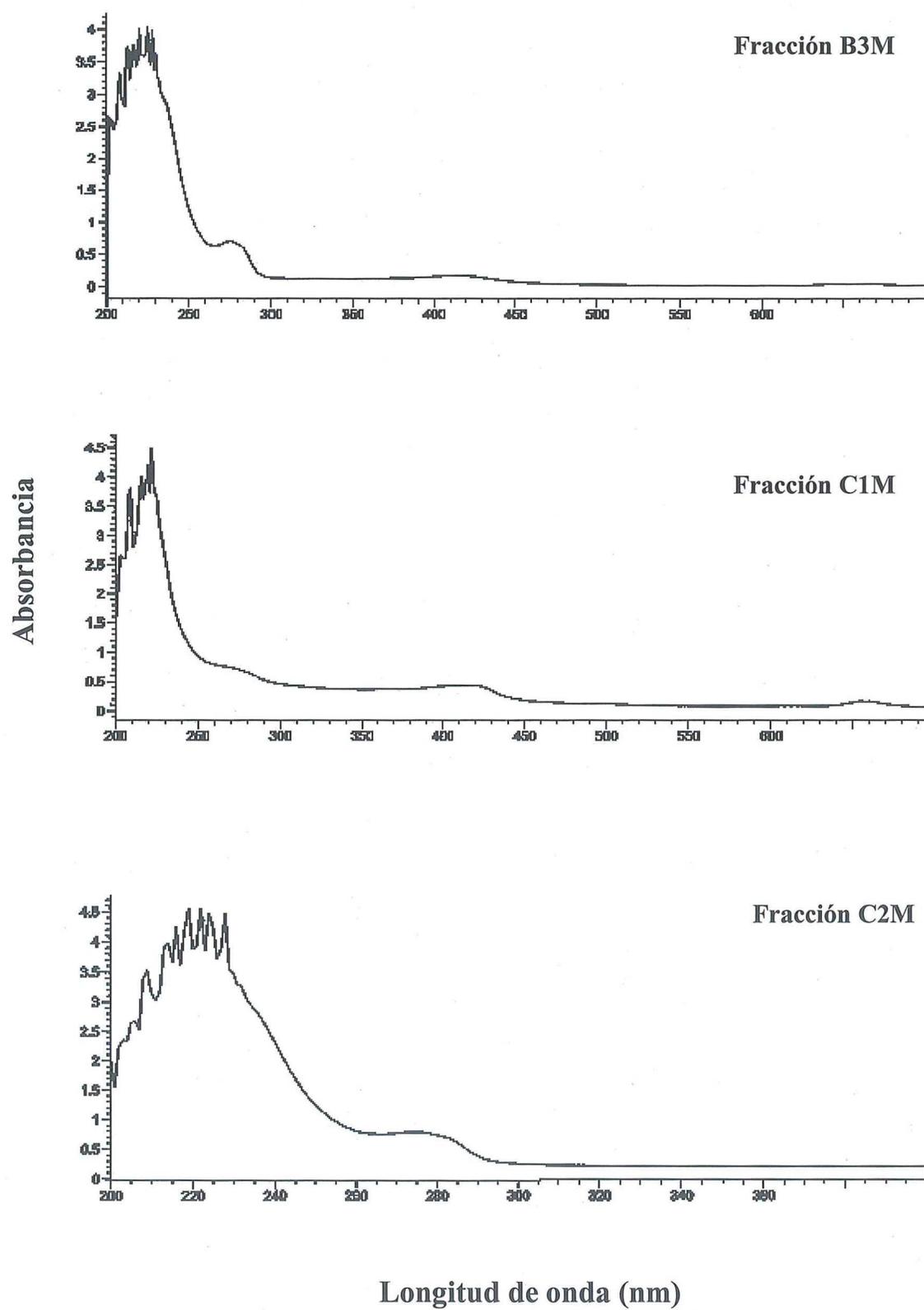


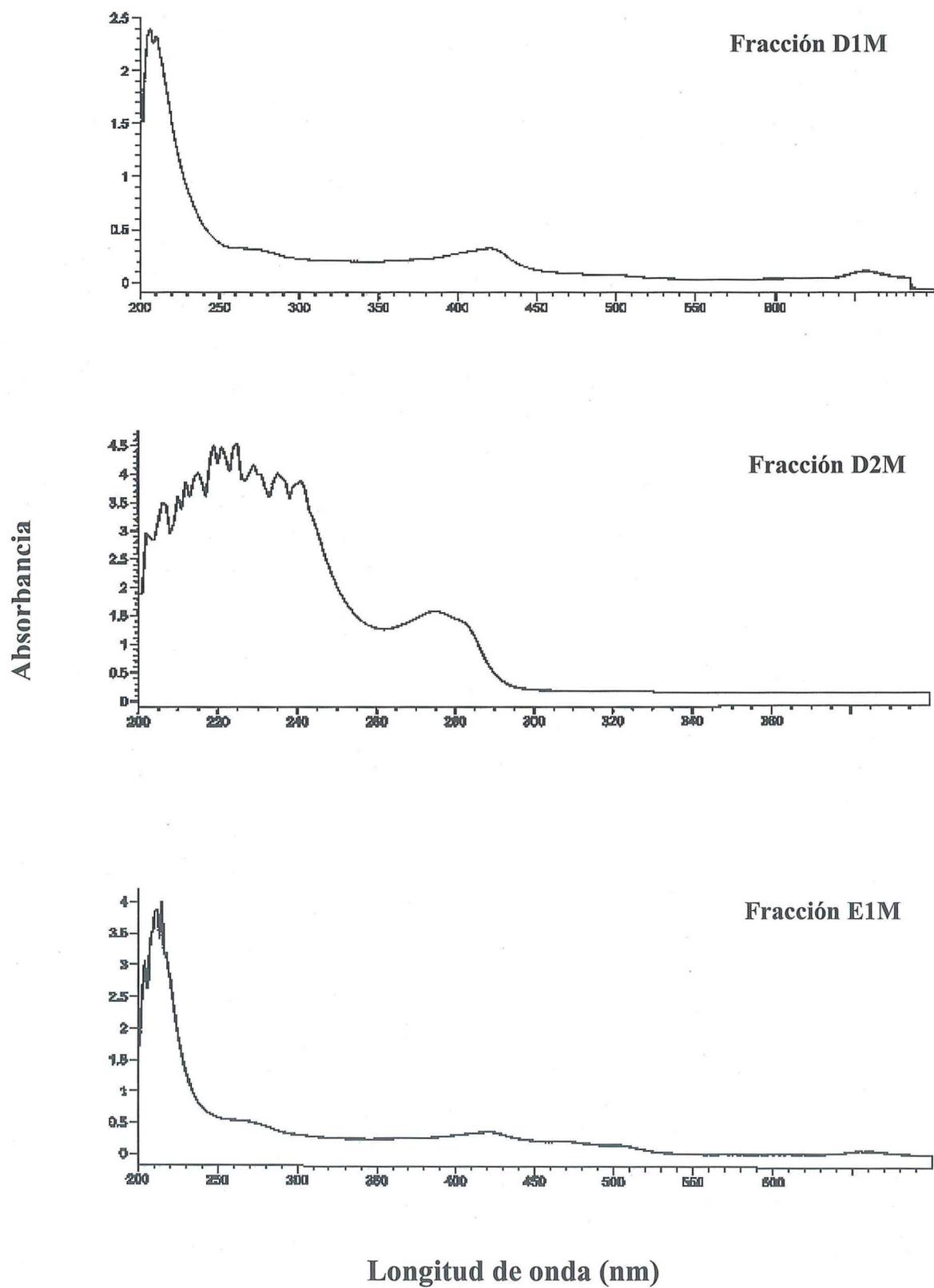


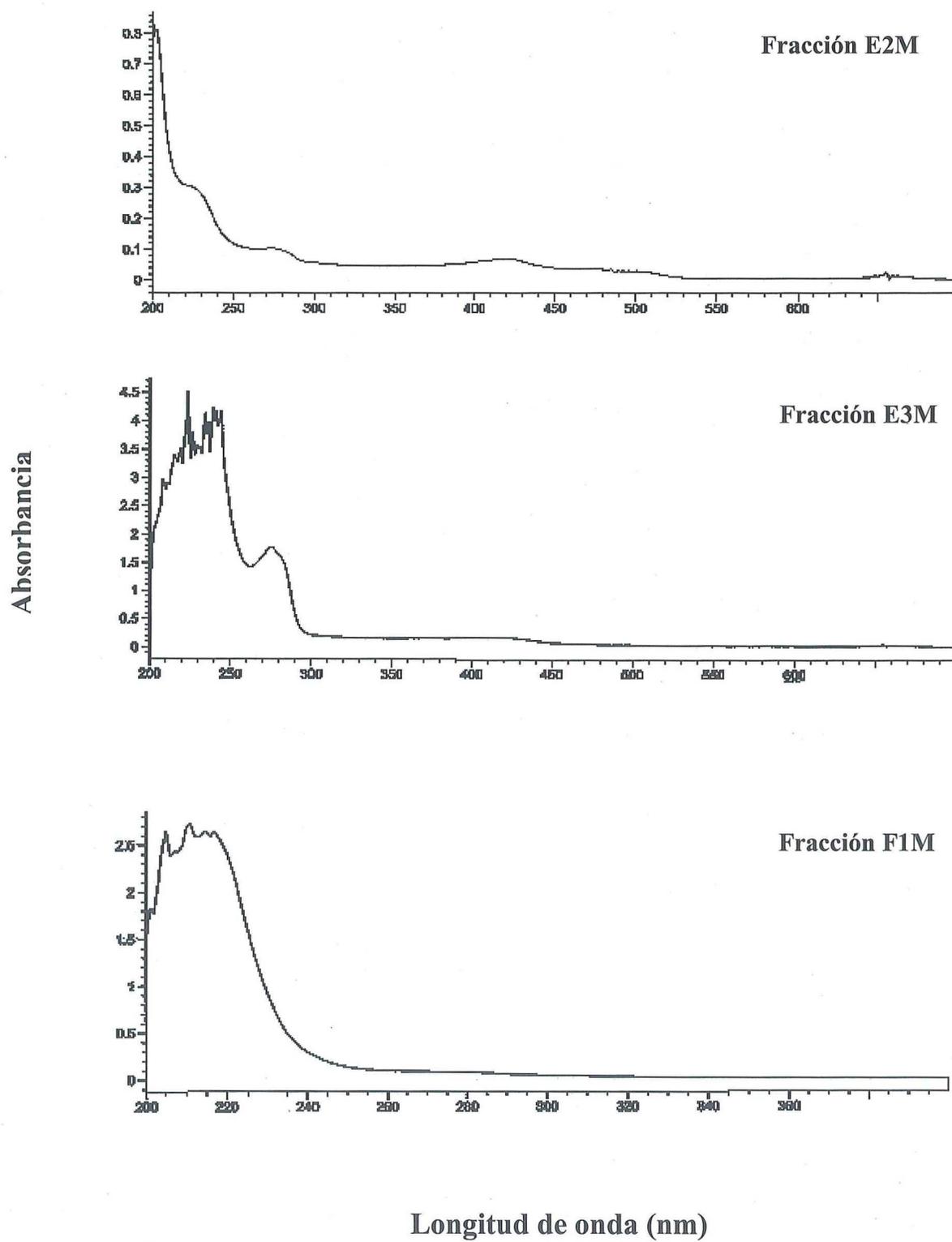
ANEXO II. Picos de absorción en la región ultravioleta (200-400 nm) de las fracciones de Metanol (M). Ver Tabla III para referencia de las cepas.

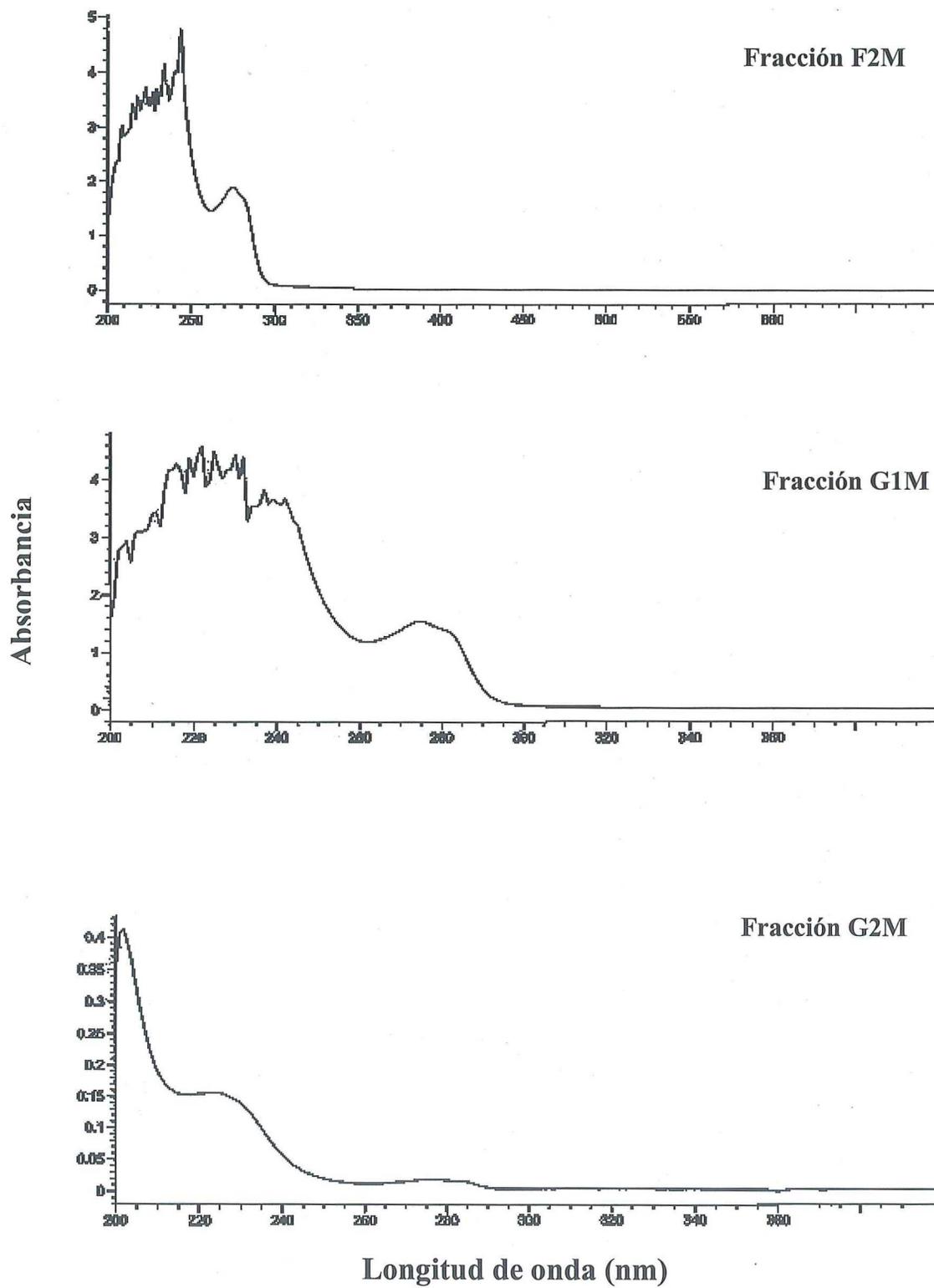


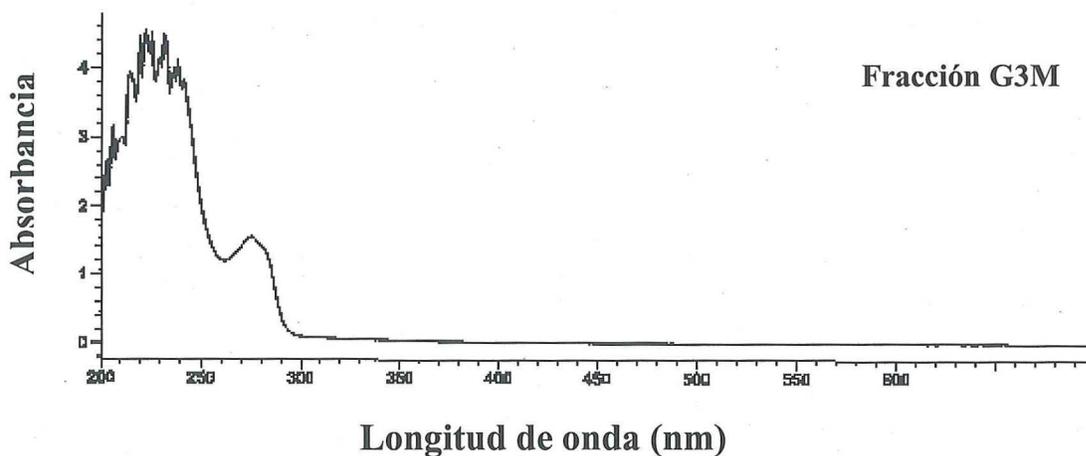












ANEXO III. Listado de la biomasa liofilizada de algunas de las cepas de cianobacterias de la Colección de cianobacterias marinas del Lab. de Microbiología Molecular del Departamento de Biotecnología Marina del CICESE.

CLAVE	PROCEDENCIA
UNICBC	Bahía Concepción, B.C.S., México
SEBC9908-2	Bahía Concepción, B.C.S., México
E8BC12	Bahía Concepción, B.C.S., México
E6BC9908-6	Bahía Concepción, B.C.S., México
E6GN9908-6	Guerrero. Negro, B.C.S., México
D2100EGA-5	Guerrero. Negro, B.C.S., México
C12	Guerrero. Negro, B.C.S., México
AE4M1GN	Guerrero. Negro, B.C.S., México
2aSQ	Brazo de San Quintín, B.C., México
9SQ	Brazo de San Quintín, B.C., México
E8M1SQ	Brazo de San Quintín, B.C., México
15bSQ	Brazo de San Quintín, B.C., México
17bSQ9910	Brazo de San Quintín, B.C., México
27SQ	Brazo de San Quintín, B.C., México
GEDA	Punta Banda, B.C., México
PCP2b9510-I	Colección CIBNOR
PCB9602-6	Colección CIBNOR
O3	Donación UABC
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	Donación Golden, 1999
<i>Synechococcus</i> sp. PCC7942	Donación Golden, 1998

