

Tesis defendida por
Jannette Berenice Martínez Guillén
y aprobada por el siguiente comité

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Codirector del Comité

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Codirector del Comité

Dra. Ernestina Castro Longoria
Miembro del Comité

Dra. María Lucila del Carmen Lares
Reyes
Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Coordinador del Programa de Posgrado
en Ciencias de la Vida

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

25 de octubre de 2012.

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN CIENCIAS DE LA VIDA CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
MARINA**

Bioprospección de la actividad antimicrobiana y biotóxica de
extractos de cianobacterias y microalgas

Tesis

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Jannette Berenice Martínez Guillén

Ensenada, Baja California, México

2012

RESUMEN de la tesis de Jannette Berenice Martínez Guillén, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California. México. Octubre de 2012.

Bioprospección de la actividad antimicrobiana y biotóxica de extractos de cianobacterias y microalgas

Resumen aprobado por:

Dra. Elizabeth Ponce Rivas

Codirector de tesis

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra

Codirector de tesis

En las últimas décadas la resistencia antimicrobiana ha sido observada a nivel mundial en varios microorganismos patógenos, debido a ello, la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana contra cepas patógenas para el ser humano se ha convertido en algo cada vez más importante. Los microorganismos marinos, en particular, las cianobacterias y microalgas, producen diversos tipos de metabolitos secundarios novedales con actividad antiviral y anticancerígena, así como compuestos con actividad antibacteriana y antimicótica. Por lo anterior, este trabajo estuvo enfocado en la bioprospección de la actividad antimicrobiana y el efecto biotóxico de extractos de cianobacterias y microalgas.

A partir de muestras de biomasa y sobrenadante del cultivo de veintiocho especies de microalgas y cianobacterias marinas, recuperadas en la fase estacionaria de crecimiento y se realizaron extracciones (agua, cloroformo y diclorometano). La actividad antimicrobiana de los 168 extractos fue evaluada contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* por el método de difusión en disco utilizando una concentración de 1 mg ml⁻¹ de extracto. Los resultados mostraron un efecto antimicrobiano en 3 extractos orgánicos: a partir de la biomasa de *Nannochloropsis oculata* (cloroformo) y del sobrenadante de *Dunaliella tertiolecta* (diclorometano) que inhibieron el crecimiento de *E. coli*; el sobrenadante de *Nitzschia thermalis* var. *minor* (cloroformo) que inhibió el crecimiento de *C. albicans*. Cinco extractos acuosos, todos provenientes de muestras de sobrenadantes de *Chaetoceros* sp., *Isochrysis* sp., *N. oculata*, *Thalassiosira pseudonana* y *Synechocystis* sp., que inhibieron el crecimiento de *B. subtilis*. Estos mismos extractos fueron evaluados por el método de microdilución, observando que al cabo de un mes de almacenados a -20°C, fue observado que la actividad de los extractos fue perdida por el proceso de congelado y descongelado de las muestras. Posteriormente, se evaluó el efecto tóxico de estos extractos utilizando a *Artemia franciscana* como organismo modelo. El único extracto tóxico contra nauplios de *Artemia* fue el obtenido del sobrenadante del cultivo de *N. thermalis* var. *minor* con cloroformo, el cual tuvo una LC₅₀-24 h de 773.4 mg l⁻¹.

Palabras clave: **Extractos, actividad antimicrobiana, efecto biotóxico, microalgas, cianobacterias.**

Abstract of the thesis presented by Jannette Berenice Martínez Guillén as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology. Ensenada, Baja California, México. October 2012.

Bioprospection of antimicrobial activity and biotoxic effects of cyanobacteria and microalgae extracts

In recent decades antimicrobial resistance has been observed worldwide in several pathogen microorganisms, as a result, the search for new compounds with antimicrobial activity against pathogen strains to humans has become increasingly important. Marine microorganisms, particularly cyanobacteria and microalgae produce various types of novel secondary metabolites with antiviral and anticancer activity, and compounds with antibacterial and antimycotic activity. Therefore, this work was focused on the bioprospection of antimicrobial activity and biotoxic effects of cyanobacteria and microalgae extracts.

From samples of biomass and culture supernatant of twenty-eight species of marine microalgae and cyanobacteria, recovered in the stationary growth phase, extractions were performed (water, chloroform and dichloromethane). The antimicrobial activity of the 168 extracts was assessed against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* by the disk diffusion method using a concentration of 1 mg ml⁻¹ of extract. The results showed an antimicrobial effect in 3 organic extracts: *Nannochloropsis oculata* biomass (chloroform) and *Dunaliella tertiolecta* supernatant (dichloromethane) inhibited the growth of *E. coli*; the supernatant of *Nitzschia thermalis* var. *minor* (chloroform) inhibited the growth of *C. albicans*. Five aqueous extracts, all obtained from supernatants of *Chaetoceros* sp., *Isochrysis* sp., *N. oculata*, *Thalassiosira pseudonana* and *Synechocystis* sp. inhibited the growth of *B. subtilis*. These same extracts were evaluated, by the microdilution method, after a month of storage at -20°C. It was observed that the activity of the extracts was lost by the process of freezing and thawing of the samples. Subsequently, the toxic effect of these extracts was evaluated using *Artemia franciscana* as a model organism. The only toxic extract against *Artemia* nauplii was the obtained from the supernatant culture of *N. thermalis* var. *minor* with chloroform, which had a LC₅₀ of 773.4 mg l⁻¹.

Keywords: **Extracts, antimicrobial activity, biotoxic effect, microalgae, cyanobacteria.**

Dedicatoria

A Dios por ser la luz que guía mi vida.

A mi mami Yolanda Guillén Hernández, por enseñarme “lo importante de la vida”, por ser mi fuente de inspiración y sobre todo por el apoyo incondicional en cada una de mis decisiones.

A mi tía, por su amor y su ánimo.

A mi familia y amigos por su cariño.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por el apoyo y las facilidades prestadas durante mi estancia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca que me permitió realizar mis estudios de Maestría.

A mis codirectoras de tesis, las Dras. Elizabeth Ponce Rivas y M. del Pilar Sánchez Saavedra por compartir su tiempo y sus conocimientos, por su dedicación y por todo el apoyo que desde siempre me han brindado para la realización de este trabajo.

A los miembros del comité de tesis, la Dra. Ernestina Castro Longoria y la Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes por sus observaciones y comentarios para mejorar este trabajo.

Al Dr. Walter Daessle Heuser y a la Dra. Ernestina Castro Longoria por facilitar el liofilizador y la campana de extracción de humos.

A la Dra. Rufina Hernández Martínez y al Dr. David Hilario Covarrubias Rosales, por el interés mostrado hacia mi salud y por su apoyo para que la Dirección de Estudios de Posgrado del CICESE me otorgara una beca para concluir la escritura de esta tesis.

A Brisa Ramírez, Angyell Maza y a Norberto Flores por su ayuda y tiempo empleado en las actividades del laboratorio. A Estrella Núñez, Socorro Jiménez y Ceres Molina por su ayuda en las cuestiones teóricas y técnicas.

A mis todos mis compañeros, técnicos y personal de CICESE.

Contenido

	Página
Resumen en español	i
Resumen en inglés	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice de Figuras	viii
Índice de Tablas	xi
1. Introducción	1
1.1. Antimicrobianos	1
1.2. El medio marino como fuente de compuestos con actividad biológica	2
1.3. Microalgas	3
1.4. Cianobacterias	4
2. Antecedentes	7
2.1. Actividad antimicrobiana y biotóxica de microalgas	7
2.2. Actividad antimicrobiana y biotóxica de cianobacterias	10
3. Justificación	13
4. Hipótesis	14
5. Objetivos	15
5.1. Objetivo general	15

5.2. Objetivos específicos	15
6. Materiales y Métodos	16
6.1. Muestras liofilizadas	16
6.2. Obtención de la curvas de crecimiento de los microorganismos patógenos de prueba	18
6.3. Selección de la concentración de dimetil sulfóxido (C ₂ H ₆ SO, DMSO) inocua para los microorganismos prueba y selección de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del antibiótico control	19
6.4. Obtención de extractos	23
6.5. Susceptibilidad de <i>Bacillus subtilis</i> a diferentes concentraciones de DMSO empleando filtros de papel	25
6.6. Bioensayos con microorganismos prueba (Método de Kirby-Bauer o de difusión en placa)	26
6.7. Bioensayos con microorganismos prueba (Método de microdilución)	28
6.8. Ensayos de biotoxicidad empleando como modelo a <i>Artemia franciscana</i>	31
6.8.1. Eclosión de quistes de <i>A. franciscana</i>	31
6.8.2. Evaluación de la biotoxicidad de extractos con actividad antimicrobiana	32
6.9. Análisis estadístico de los datos	33
7. Resultados	34
7.1. Obtención de la curvas de crecimiento de los microorganismos patógenos de prueba	34
7.2. Selección de la concentración de Dimetil sulfóxido (DMSO) inocua para los microorganismos prueba	36

7.3. Selección de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del antibiótico control	41
7.4. Obtención de extractos	46
7.5. Susceptibilidad de <i>B. subtilis</i> a diferentes concentraciones de DMSO empleando filtros de papel	54
7.6. Bioensayos con microorganismos prueba (Método de Kirby-Bauer o de difusión en placa)	55
7.7. Bioensayos con microorganismos prueba (Método de microdilución)	58
7.8. Ensayos de biotoxicidad empleando como modelo a <i>Artemia franciscana</i>	77
8. Discusión	81
9. Conclusiones	96
10. Perspectivas	98
11. Literatura citada	99
Anexos	1

Índice de Figuras

Figura		Página
1.	Diseño experimental para la selección de la concentración de DMSO inócua para el panel de microorganismos patógenos.	21
2.	Diseño experimental para la selección de la MIC del imipenem para el panel de microorganismos patógenos.	22
3.	Extractos analizados en los ensayos de antibiosis.	27
4.	Método de microdilución utilizando extractos de cianobacterias y microalgas.	31
5.	Cinéticas de crecimiento de los microorganismos patógenos de prueba.	35
6.	Efecto de la concentración del DMSO sobre el cultivo de <i>E. coli</i> . Las barras indican la desviación estándar.	37
7.	Efecto de la concentración del DMSO sobre el cultivo de <i>B. subtilis</i> . Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.001$:***; $P < 0.05$:*.	38
8.	Efecto de la concentración del DMSO sobre el cultivo de <i>P. aeruginosa</i> . Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.001$:***.	39
9.	Efecto de la concentración del DMSO sobre el cultivo de <i>C. albicans</i> . Las barras indican la desviación estándar.	40
10.	Efecto de la concentración del imipenem sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> . Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.001$:***.	42
11.	Efecto de la concentración del imipenem sobre el crecimiento de <i>B. subtilis</i> . Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.001$:***.	43
12.	Efecto de la concentración del imipenem sobre el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> . Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.001$:***.	44
13.	Efecto de la concentración del imipenem sobre el crecimiento de <i>C. albicans</i> . Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.001$:***.	45
14.	Efecto del extracto de biomasa de <i>N. oculata</i> con cloroformo	59

- sobre el cultivo de *E. coli*. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.001$:***; $P < 0.01$:** y $P < 0.05$:*.
15. Cambios en la actividad antimicrobiana del extracto de biomasa de *N. oculata* con cloroformo sobre el cultivo de *E. coli* por efecto del tiempo de almacenamiento y manipulación. Las barras indican la desviación estándar. 60
16. Efecto del extracto del sobrenadante del cultivo de *D. tertiolecta* con diclorometano sobre el cultivo de *E. coli*. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.001$:***; $P < 0.01$:** y $P < 0.05$:*. 61
17. Cambios en la actividad antimicrobiana del extracto del sobrenadante del cultivo de *D. tertiolecta* con diclorometano sobre el cultivo de *E. coli* por efecto del tiempo de almacenamiento y manipulación. Las barras indican la desviación estándar. 62
18. Efecto del extracto del sobrenadante del cultivo de *N. thermalis* var. *minor* con cloroformo sobre el cultivo de *C. albicans*. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.05$:*. 63
19. Cambios en la actividad antimicrobiana del extracto del sobrenadante del cultivo de *N. thermalis* var. *minor* con cloroformo sobre el cultivo de *C. albicans* por efecto del tiempo de almacenamiento y manipulación. Las barras indican la desviación estándar. 64
20. Efecto de las sales del H₂O_m sobre la absorbancia medida a 600 nm del Medio Müeller-Hinton. Las barras indican la desviación estándar. 65
21. Efecto de las sales del H₂O_m sobre el cultivo de *B. subtilis*. Las barras indican la desviación estándar. 66
22. Efecto del extracto acuoso del sobrenadante de *Chaetoceros* sp. sobre el cultivo de *B. subtilis*. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.05$:*. 67
23. Cambios en la actividad antimicrobiana del extracto acuoso del sobrenadante de *Chaetoceros* sp. sobre el cultivo de *B. subtilis* por efecto del tiempo de almacenamiento y manipulación. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.05$:*. 68
24. Efecto del extracto acuoso del sobrenadante de *Isochrysis* sp. sobre el cultivo de *B. subtilis*. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.05$:* y $P < 0.01$:**. 69

25.	Cambios en la actividad antimicrobiana del extracto acuoso del sobrenadante de <i>Isochrysis</i> sp. sobre el cultivo de <i>B. subtilis</i> por efecto del tiempo de almacenamiento y manipulación. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.05$:*.	70
26.	Efecto del extracto acuoso del sobrenadante de <i>N. oculata</i> sobre el cultivo de <i>B. subtilis</i> . Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.05$:* y $P < 0.01$:**.	71
27.	Cambios en la actividad antimicrobiana del extracto acuoso del sobrenadante de <i>N. oculata</i> sobre el cultivo de <i>B. subtilis</i> por efecto del tiempo de almacenamiento y manipulación. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.05$:*; $P < 0.01$:** y $P < 0.001$:***.	72
28.	Efecto del extracto acuoso del sobrenadante de <i>T. pseudonana</i> sobre el cultivo de <i>B. subtilis</i> . Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.05$:* y $P < 0.01$:**.	73
29.	Cambios en la actividad antimicrobiana del extracto acuoso del sobrenadante de <i>T. pseudonana</i> sobre el cultivo de <i>B. subtilis</i> por efecto del tiempo de almacenamiento y manipulación. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.01$:**.	74
30.	Efecto del extracto acuoso del sobrenadante de <i>Synechocystis</i> sp. sobre el cultivo de <i>B. subtilis</i> . Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.001$:***; $P < 0.01$:** y $P < 0.05$:*.	75
31.	Cambios en la actividad antimicrobiana del extracto acuoso del sobrenadante de <i>Synechocystis</i> sp. sobre el cultivo de <i>B. subtilis</i> por efecto del tiempo de almacenamiento y manipulación. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.05$:*; $P < 0.001$:***.	76
32.	Evaluación de la toxicidad del extracto de <i>N. oculata</i> y de <i>D. tertiolecta</i> contra nauplios de <i>A. franciscana</i> . Las barras indican la desviación estándar.	78
33.	Evaluación de la toxicidad del extracto de <i>N. thermalis</i> var. <i>minor</i> contra nauplios de <i>A. franciscana</i> . Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.001$:*** y $P < 0.01$:**.	79
34.	Evaluación de la toxicidad del extracto de <i>Chaetoceros</i> sp., <i>Isochrysis</i> sp., <i>N. oculata</i> , <i>T. pseudonana</i> y <i>Synechocystis</i> sp. contra nauplios de <i>A. franciscana</i> . Las barras indican la desviación estándar.	80
A1.	Curva estándar de McFarland	2

Índice de Tablas

Tabla		Página
1.	Cepas de microalgas y cianobacterias de las que se obtuvieron muestras de biomasa y sobrenadante liofilizadas	17
2.	Constante de velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (g) de microorganismos prueba	36
3.	Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del imipenem para el panel de microorganismos prueba	46
4.	Masa en peso seco (g) de las extracciones con agua (A), cloroformo (C) y diclorometano (D), así como su rendimiento y pérdida a partir de muestras liofilizadas de biomasa de cultivos de cianobacterias y microalgas	48
5.	Masa en peso seco (g) de las extracciones con agua (A), cloroformo (C) y diclorometano (D), así como su rendimiento y pérdida a partir de muestras liofilizadas de sobrenadantes de cultivos de cianobacterias y microalgas	51
6.	Susceptibilidad de <i>B. subtilis</i> a concentraciones de DMSO utilizando filtros de papel	54
7.	Ensayo de difusión en placa para la selección de extractos orgánicos y acuosos con actividad antimicrobiana	57
A1.	Curva estándar de McFarland (Turbidimetría)	1

1. Introducción

1.1. Antimicrobianos

En 1928 Alexander Fleming, observando el fenómeno de inhibición del crecimiento de cultivos de bacterias por el hongo *Penicillium notatum*, consiguió aislar una sustancia de acción antiséptica selectiva producida por este hongo, a la que denominó penicilina. Sin embargo, no fue sino hasta la Segunda Guerra Mundial que Florey y colaboradores en 1942, consiguieron aplicar esta terapia a las enfermedades infecciosas y producir este compuesto industrialmente. En 1944, Waksman y colaboradores, lograron extraer otro antibiótico de gran importancia, la estreptomicina del actinomicete *Streptomyces griseus*. Desde entonces la estreptomicina se ha sintetizado artificialmente. Los antibióticos actúan de dos formas: inhibiendo el crecimiento de las bacterias (acción bacteriostática) o destruyéndolas (acción bactericida). En algunos casos inhiben las enzimas que originan la formación de la membrana celular de las bacterias; en otros casos interfieren en las reacciones enzimáticas del metabolismo intermedio o impiden por el mismo mecanismo la síntesis de proteínas. La aplicación farmacológica de los antibióticos tiene que responder a dos factores: inhibir *in vivo* la proliferación de gérmenes y no ser perjudicial para el organismo. Al número de microorganismos sensibles a la acción de un antibiótico se le denomina espectro de acción (Madigan *et al.*, 1995).

En la actualidad el mercado mundial de los agentes antiinfecciosos en Estados Unidos de América (EE. UU.) se encuentra valorado en 66.5 mil millones de dólares americanos, siendo los agentes antibacterianos uno de los tres medicamentos más recetados, los cuales representan el 50% de dichas ventas (Zuluaga, 2009).

En las últimas décadas la resistencia antimicrobiana ha sido observada a nivel mundial en varios microorganismos patógenos, incluidos recientemente algunos que son sensibles a los antibióticos. Asimismo se han reportado brotes de otras especies oportunistas que también pueden ser patógenas, las cuales una vez que ha pasado el efecto del químico utilizado como antibiótico encuentran las condiciones idóneas para su proliferación (Maeda *et al.*, 1997). Debido al aumento de patógenos resistentes, a la evolución de enfermedades emergentes (SIDA, virus Hanta, virus del Ébola, Enfermedad de Lyme, *Escherichia coli* 0157:H7), a la existencia de bacterias resistentes de forma natural (*Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística) y a la toxicidad observada de algunos de los actuales medicamentos, se requiere continuamente la identificación y producción de nuevos antibióticos (Demain, 1999).

1.2. El medio marino como fuente de compuestos con actividad biológica

A principios de 1960 los investigadores empezaron a ver a los océanos como un recurso intacto y novedoso de compuestos potencialmente útiles, lo cual no es de sorprender, considerando que los océanos cubren dos terceras partes de la Tierra (Burja *et al.*, 2001; Marris, 2006). El medio marino tiene gran diversidad biológica y debido a los mecanismos de adaptación y supervivencia de los organismos, generalmente se encuentra asociado a una gran variedad de sustancias químicas. Esta diversidad ha sido la fuente de compuestos químicos novedosos con potencial uso para el desarrollo industrial de productos farmacéuticos, cosméticos, suplementos nutricionales, sondas moleculares, enzimas, productos de química fina y agroquímicos. Durante las últimas cuatro décadas numerosos compuestos nuevos han sido aislados de organismos marinos y se ha demostrado que muchos de estos compuestos poseen actividad biológica como: actividad anticancerígena y citotóxica, antibacterial, antifúngica, inmunosupresora, algicida, antiinflamatoria y antioxidante, entre otras (El Gamal, 2010). Cada una de estas clases de bioproductos marinos tiene un valor potencial en el mercado de miles de

millones de dólares (Pomponi, 1999). Sin embargo, solamente entre el 1 y el 10% de todos los microorganismos marinos (incluidas microalgas y cianobacterias) son cultivados por técnicas comunes para la obtención de subproductos de interés industrial (Burja *et al.*, 2001).

1.3. Microalgas

Las algas son organismos que contienen cloroplastos, están compuestas de una célula o bien células agrupadas en colonias y varían mucho en tamaño ya que las formas unicelulares miden de 3-10 μm . Las algas se encuentran en diversos ambientes: en el mar, ríos y lagos, en el suelo, en animales y plantas (como endosimbiontes colaborando juntos). De hecho se pueden encontrar en casi todos los lugares donde haya luz para llevar a cabo la fotosíntesis (El Gamal, 2010).

Dentro de las características principales de las microalgas, se encuentran, que poseen membranas especializadas donde se realiza la respiración y la fotosíntesis, presentan membranas ricas en esteroides, son insensibles a la estreptomycin y al cloranfenicol. Sin embargo presentan sensibilidad a la ciclohexamida y algunos grupos presentan sensibilidad a la penicilina. La citosis es común y presentan ocasionalmente endosimbiosis. La movilidad es común y tienen diversos mecanismos que incluyen flagelos para propulsión y pueden reptar en superficies planas. La fijación de nitrógeno está ausente y son aerobios obligados. Usualmente no pueden tolerar temperaturas mayores a los 40°C (Taylor, 1980).

El fitoplancton comprende organismos tales como las diatomeas (*Bacillariophyta*), dinoflagelados (*Dinophyta*), flagelados verdes y flagelados amarillo-marrón (*Chlorophyta*; *Prasinophyta*, *Prymnesiophyta*, *Cryptophyta*, *Chrysophyta* y *Rhaphidophyta*) y algas verde-azul (*Cyanophyta* "cianobacterias"). Como organismos fotosintéticos, este grupo juega un papel clave en la productividad de

los océanos y constituye la base de la cadena alimentaria marina (El Gamal, 2010).

Las microalgas, al igual que las plantas, producen una variedad de compuestos, los cuales se denominan colectivamente como metabolitos secundarios. Son sintetizados por el organismo al final de la primera fase de crecimiento y en la fase estacionaria. Las “moléculas bioactivas” son sustancias que pueden afectar los procesos de la vida en bajas concentraciones, de manera benéfica o perjudicial (Skulberg, 2000). Los compuestos producidos por las microalgas en el descubrimiento de fármacos son prioritarios, especialmente, en la lucha contra las infecciones virales y contra el cáncer, así como para el combate de hongos y de las infecciones de bacterias resistentes a los antibióticos (Venkatesan *et al.*, 2007).

Los dinoflagelados son un grupo dentro del fitoplancton, que se encuentran taxonómicamente clasificados entre procariotas y eucariotas, a veces llamados mesocariotas. Esta situación única hace a estos organismos interesantes para la producción de metabolitos secundarios, muchos de los cuales no tienen precedentes con los metabolitos secundarios de origen terrestre. Ciertas especies de estos microorganismos producen toxinas, las cuales pueden estar involucradas en la intoxicación humana por la ingesta de crustáceos contaminados con éstas (Fusetani y Kem, 2009). Las toxinas de estos organismos, generalmente se clasifican en venenos paralizantes o diarreicos de crustáceos (El Gamal, 2010). Los tipos de estructuras de los metabolitos de los dinoflagelados incluyen ampliamente compuestos heterocíclicos, a partir de éteres policíclicos, policétidos oxigenados y macrólidos (Shimizu, 2003).

1.4. Cianobacterias

Las cianobacterias o algas verde-azules son la forma de vida más exitosa y antigua que sigue presente en la Tierra y se encuentran en casi todos los hábitats.

Son procariontes cosmopolitas que han sobrevivido en la Tierra desde hace 3500 millones de años. Estos organismos fueron los primeros fotótrofos productores de oxígeno sobre el planeta y fueron los responsables de la transformación de una atmósfera terrestre anóxica a una atmósfera óxica (Madigan *et al.*, 1995). Las estructuras más comunes en el registro fósil de cianobacterias son los estromatolitos y oncolitos (Campbell y Reece, 2007).

Las cianobacterias muestran muchas características estructurales en común con las bacterias; sin embargo se han clasificado dentro del grupo de las algas por contener clorofila *a* y pigmentos accesorios (β -caroteno) (El Gamal, 2010). Con base en su ultraestructura están clasificadas como bacterias Gram-negativas (Stanier y Cohen-Bazire, 1977) fotótrofas oxigénicas. Algunas de las características morfológicas utilizadas en taxonomía de las cianobacterias incluyen variaciones en la estructura del tallo tales como la presencia de unicélulas (como *Synechocystis*), colonias de células individuales (como *Aphanothece*), filamentos no ramificados (como *Lyngbya*) y filamentos ramificados (como *Stigonema*) (Graham y Wilcox, 2000). Los tipos filamentosos pueden ser delgados o tricomas gruesos, individuales o paquetes ya sea con o sin vaina (mucílago) (El Gamal, 2010).

Como resultado de la supervivencia en ecosistemas terrestres y acuáticos, las cianobacterias presentan una serie de metabolitos secundarios, cada uno con funciones especializadas para competir con éxito en su hábitat; sintetizando moléculas complejas tales como: lipopéptidos cíclicos y lineales noveles, ácidos grasos, péptidos, depsipéptidos, policétidos, alcaloides, entre otros, lo que ha fascinado a los investigadores por su potencial aprovechamiento farmacéutico y biotecnológico (Barrios-Llerena *et al.*, 2007).

En los últimos años, las cianobacterias han tenido mucha atención como una fuente rica de compuestos bioactivos y han sido consideradas como uno de los

grupos más prometedores de organismos que los producen, en especial las cianobacterias de origen marino y de agua dulce, estos metabolitos de interés incluyen antibacterianos, antifúngicos, antivirales, anticancerígenos, antiplasmodiales, algicidas y agentes inmunosupresores (Abed *et al.*, 2009). La detección de antibióticos provenientes de cianobacterias ha abierto una nueva área para descubrir nuevos fármacos. La mayoría de las sustancias con actividad antibacteriana aisladas de cianobacterias pertenecen a grupos de los ácidos grasos, otros ácidos orgánicos, bromofenoles, otros inhibidores fenólicos, taninos, terpenoides, polisacáridos y otros carbohidratos, alcoholes, policétidos, amidas, alcaloides y péptidos. Asimismo el cultivo de cianobacterias sin sustratos orgánicos puede ser una ventaja económica para la producción de estos compuestos sobre otros microorganismos (Kreitlow *et al.*, 1999).

Las toxinas de cianobacterias o cianotoxinas son otra clase de metabolitos secundarios que han recibido atención recientemente por diferentes agrupaciones científicas. Estas toxinas pueden clasificarse en cinco grupos funcionales sobre la base de sus efectos biológicos, tales como hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas, dermatotoxinas y toxinas con potencial irritante (lipopolisacáridos), actuando también en el sistema del tracto gastrointestinal (Rastogi y Sinha, 2009). Las toxinas que han sido estudiadas intensamente hasta la fecha, pertenecen al grupo de neurotoxinas y hepatotoxinas. Las neurotoxinas interfieren con el funcionamiento del sistema nervioso y con frecuencia causan la muerte en cuestión de minutos, llevando a la parálisis de los músculos respiratorios. Las hepatotoxinas, dañan el hígado y causan que la sangre se acumule interfiriendo con la función hepática normal lo que puede llevar durante varios días a la muerte por insuficiencia hepática (Carmichael, 1994). Las cianobacterias tienen muchas aplicaciones biotecnológicas, tales como el uso en la maricultura, alimentos, combustibles, fertilizantes, colorantes, en la producción de toxinas, vitaminas, enzimas y productos farmacéuticos entre otras diversas aplicaciones (Abed *et al.*, 2009).

2. Antecedentes

2.1. Actividad antimicrobiana y biotóxica de microalgas

Las algas marinas planctónicas son ampliamente mencionadas como un recurso potencial de sustancias antibacteriales y antifúngicas. Hasta donde se conoce, el primer reporte de actividad antibacteriana en una microalga fue descrito por Shirahama (1942), quien investigó que *Cystophyllum hakodatense* tenía efecto sobre *Lactobacillus bulgaris* y *Lactobacillus helveticus*. Sieburth en 1960, observó que la microalga de origen marino de la Antártica *Phaeocystis pouchetii*, es ingerida por *Euphasia*, que a su vez, es el alimento básico de los pingüinos, lo que al parecer modifica la microflora gastrointestinal de los pingüinos por la ingesta de la microalga incluida en el alimento.

La diatomea *Skeletonema costatum*, fue responsable de la actividad anticolidorme del agua de mar alrededor de Rhode Island durante los florecimientos de esta especie (Sieburth, 1964).

Parke y Dixon en 1976 llevaron a cabo el análisis de extractos acuosos y con solventes orgánicos de material colectado o cultivado. Entre los microorganismos probados en los diferentes ensayos, los más utilizados fueron la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*, la levadura *Candida albicans*, el hongo *Aspergillus fumigatus*, la dermatofyta *Trichophyton mentagrophytes* y entre las cepas de bacterias marinas *Flavobacterium* y *Vibrio* sp. Taxonómicamente, la actividad antibacteriana predominó entre especies de *Chrysophyta* con las Bacillariophyceae *Chaetoceros*, *Nitzschia* y *Thalassiosira*.

Se ha evaluado la actividad antimicrobiana de 132 especies de microalgas marinas cultivadas bajo condiciones de laboratorio contra 6 especies de bacterias, siendo los extractos obtenidos con solventes orgánicos los que presentaron mejor actividad. Las especies que presentaron mayor susceptibilidad a los extractos fueron *S. aureus* y *Bacillus subtilis* (Kellam y Walker, 1989). En general se ha observado que las algas inhiben el crecimiento bacteriano más que el de los hongos (Pesando, 1990).

La actividad antibiótica examinada en algunas diatomeas como *Asterionella* sp. ha sido atribuida en su mayoría a derivados de ácidos grasos, ya que contiene un grupo de compuestos llamados asterionellina A, B y C, que tienen estructuras únicas (Shimizu, 2003).

A partir de la biomasa de *Rhizosolenia alata*, una diatomea de origen marino, se han realizado extracciones con disolventes orgánicos como: acetona, cloroformo, cloroformo:metanol (1:1), metanol:agua destilada (4:1) y agua destilada. Los extractos con los solventes orgánicos y sus mezclas mostraron actividad antibacteriana contra bacterias patógenas para el hombre tales como: *B. subtilis*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi* y *Vibrio cholerae*. Sin embargo no se reportó actividad antimicrobiana con ninguno de los extractos acuosos (Venkatesan *et al.*, 2007).

Se ha reportado que la microalga *Phorphyridium* sp. inhibe el crecimiento de diferentes cepas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, levaduras y hongos (Abed *et al.*, 2009).

El producto de la lisis de la diatomea marina *Phaeodactylum tricornerum* presentó actividad antibacteriana sobre una cepa multiresistente de *S. aureus*. Dicha actividad antibacteriana proviene del ácido eicosapentanoico (EPA), un ácido graso poli-insaturado (Desbois *et al.*, 2009).

Diferentes especies de fitoplancton, entre ellas *Synechococcus elongatus*, *Synechocystis* sp., *Amphiprora paludosa*, *Phorphyridium cruentum* y *Chaetoceros muelleri* han mostrado actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, utilizando hexano, diclorometano y metanol como solventes para la extracción (Sánchez-Saavedra *et al.*, 2010).

Muchos metabolitos de los dinoflagelados muestran una actividad biológica potente como bloqueadores altamente selectivos de varios canales de Na⁺ (El Gamal, 2010). Tal es el caso de la toxina conocida como saxitoxina, la cual fue aislada por primera vez a partir de *Saxidomas giganteusen*, una almeja de Alaska; dicha molécula al unirse a la superficie externa del poro inhibe el voltaje de los canales dependientes de este ion (Fusetani y Kem, 2009).

Muchos compuestos metabolizados por los dinoflagelados con estructura química de poliéter son tóxicos. La brevetoxina B, es un componente ictiotóxico de *K. brevis*, este compuesto fue el primer “poliéter en forma de escalera” aislado de la naturaleza. *Gambierdiscus toxicus*, produce una gran variedad de poliéteres con potentes actividades biológicas como la maitotoxina y el gambierol. El primero aumenta la permeabilidad de la membrana a Ca²⁺ por un mecanismo aún desconocido y es el poliéter más complejo aislado de la naturaleza y el producto más tóxico conocido (LD₅₀ ratón 50 ng kg⁻¹). El gambierol en cambio, inhibe fuertemente el voltaje de los canales dependientes de K⁺ con un valor de LC₅₀ de 1.8 ng ml⁻¹ y es tóxico para los ratones con una LD₅₀ 50 mg kg⁻¹.

Entre los macrólidos producidos por dinoflagelados se encuentra el goniiodomin A, aislado de *Alexandrium hiranoi* (*Goniodoma pseudogonyaulax*), dicho compuesto, estimula la actividad actomiosina ATPasa (El Gamal, 2010; Fusetani y Kem, 2009).

2.2. Actividad antimicrobiana y biotóxica de cianobacterias

Las cualidades medicinales de las cianobacterias han sido apreciadas desde el año 1500 A.C. en donde las especies de *Nostoc* fueron utilizadas para tratar la gota, la fístula y varias formas de cáncer (Metting y Pyne, 1986). Sin embargo, antes de la década de 1990 se llevaron a cabo investigaciones limitadas en el aislamiento de productos naturales biológicamente activos a partir de cianobacterias. Dichos compuestos son eficaces contra bacterias Gram-positivas y/o Gram-negativas. Cepas de cianobacterias tóxicas y no tóxicas son productoras de compuestos antibacterianos, diferentes a las cianotoxinas.

A partir del extracto de diclorometano de una variedad de la cianobacteria de aguas poco profundas *Lyngbia majuscula* fue aislada la γ -lactona malingolida, la cual resultó ser un compuesto antimicrobiano efectivo contra *Mycobacterium smegmatis* y *Streptococcus pyogenes* (Cardllina *et al.*, 1979).

Una clase de diterpenos extracelulares noveles aislados de *Nostoc* han demostrado una actividad antibacteriana prometedora contra la biopelícula (biofilm) que forma *Staphylococcus epidermis* (Jaki *et al.*, 1999).

A partir de la extracción con n-hexano de la biomasa de la cianobacteria *Oscillatoria redekei* (Mundt *et al.*, 2003), se aisló una mezcla de dos hidroxiácidos grasos insaturados, los cuales inhiben el crecimiento de la bacteria Gram-positiva *B. subtilis* SBUG14, *Micrococcus flavus* SBUG16 y *S. aureus* SBUG11 y ATCC25923, pero no se observó esta respuesta contra cepas multiresistentes de *S. aureus*. A su vez, *Synechococcus leopoliensis* produce un agente antimicrobiano contra la bacteria Gram-positiva *S. aureus* ATCC25923 (Noaman *et al.*, 2004).

En el 2006 Volk y Furkert encontraron una actividad antibacteriana moderada proveniente de los exometabolitos de las cianobacterias *Nodularia harveyana* y *Nostoc insulare*, de un alcaloide indólico norharmano (9H-pirido(3,4-b)índole) y de un compuesto fenólico (4,40-dihidroxibifenil), respectivamente.

Nostoc muscorum, es otra cianobacteria la cual se sabe que sintetiza un compuesto fenólico con actividad antagónica contra bacterias Gram-positivas como *B. subtilis*, *B. cereus* y *S. aureus*; Gram-negativas como *E. coli* y *Salmonella typhi* y hongos filamentosos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavous*, *Pencillium* sp. y *Fusarium microsporium* (El-Sheekh *et al.*, 2006).

También se ha reportado que algunos compuestos como el ácido linolénico, aislado de la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. y el compuesto denominado bastadin de *Anabaena basta* presentan características antibacterianas (Miao *et al.*, 1990; Dexter *et al.*, 1993; Bhadury y Wright, 2004).

El “U. S. National Cancer Institute”, entre otras instituciones, ha guiado el inicio de programas de cribado para la búsqueda de productos naturales anticancerígenos provenientes de cianobacterias (Gerwick *et al.*, 1989).

Dentro del grupo de las *Cyanophytae* existen tres órdenes que producen la gran mayoría de compuestos tóxicos, siendo estos, *Chroococcales*, *Oscillatoriales* y *Nostocales*. Diversas especies de los géneros del plancton cianobacteriano incluido *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Mycrocystis*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Scytonema* y *Tolyphotrix* producen toxinas biológicas. Para otros géneros de cianobacterias que incluyen *Coelosphaerium*, *Fisherella*, *Gloeotrichia*, *Hapalosiphon*, *Schizothrix*, *Spirulina*, *Symploca* y *Trichodesmium*, también se ha encontrado toxicidad, pero hasta el momento las toxinas no han sido aisladas y caracterizadas (Burja *et al.*, 2001).

El grupo de Gerwik en 1994 aisló la curacina A de la cianobacteria marina *Lyngbya majuscula* de la cepa Curaso, el cual es un agente antimitótico que inhibe el ensamblaje de los microtúbulos y la unión de la colchicina a la tubulina, siendo este un importante ejemplo de un nuevo tipo de medicamento anticancerígeno (Jaki *et al.*, 1999; El Gamal, 2010; Tong, 2010).

Las microcistinas son una de las clases de mayor estudio de las toxinas de cianobacterias, son péptidos modificados no ribosomales, producidos por una gran variedad de géneros de cianobacterias como: *Anabaena*, *Microcystis*, *Hapalasiphon*, *Nostoc* y *Oscillatoria*. La estructura general de las microcistinas es descrito por el ciclo (-D-Alap1-Xaa2-D-MeAsp3-Yaa4-Adda5-D-Glu6-Mdha7); los aminoácidos Xaa2 y Yaa4 son muy variables y determinan el sufijo de la nomenclatura de las microcistinas. Estos péptidos son muy activos contra la serina/treonina proteína fosfatasa 1 y 2A, las cuales son esenciales para muchas vías de transducción de señales en células eucariotas, tal es el caso de la apoptosis (muerte celular programada). Otra clase de toxinas de cianobacterias incluye importantes alcaloides, como la anatoxina y saxitoxina. Las anatoxinas, originalmente llamados factores de muerte rápida, son neurotoxinas y afectan el sistema nervioso, la piel o el tracto gastro intestinal. En altas dosis, las anatoxinas pueden llevar a la muerte por insuficiencia respiratoria (Gademann y Portmann, 2008; Rastogi y Sinha, 2009).

3. Justificación

En vista de la creciente resistencia de las bacterias a los antibióticos comunes, la búsqueda de nuevos compuestos activos con actividad antimicrobiana contra cepas patógenas para humanos se ha convertido en algo cada vez más importante. Los microorganismos marinos, en particular las cianobacterias y microalgas, producen diversos tipos de metabolitos secundarios novedales que poseen potentes actividades biológicas de interés biomédico. Por lo anterior, este trabajo está enfocado en la evaluación de extractos de cianobacterias y microalgas para la búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos para el humano, así como la evaluación de su toxicidad empleando como modelo de estudio a *Artemia franciscana*.

4. Hipótesis

1. Se obtendrán extractos orgánicos y acuosos de cianobacterias y microalgas con actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos para el ser humano.
2. Los extractos orgánicos y acuosos de cianobacterias y microalgas con actividad antimicrobiana asimismo tendrán actividad biotóxica contra *Artemia franciscana*.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Bioprospección de extractos de cianobacterias y microalgas con actividad antimicrobiana y análisis de su efecto biotóxico utilizando a *Artemia franciscana*.

5.2. Objetivos específicos

1. Obtener extractos acuosos y orgánicos a partir de cultivos de cianobacterias y microalgas marinas.
2. Realizar ensayos de antibiosis con extractos acuosos y orgánicos obtenidos de diferentes cianobacterias y microalgas, utilizando cultivos de distintas bacterias patógenas de importancia en biomedicina.
3. Evaluar la toxicidad de los extractos cianobacterianos y microalgales que muestren actividad antimicrobiana mediante bioensayos con *Artemia franciscana*.

6. Materiales y Métodos

6.1. Muestras liofilizadas

Las muestras que se analizaron en este estudio son el resultado de un trabajo previo (González-Davis *et al.*, 2012), en donde se utilizaron 28 cepas diferentes de cianobacterias y microalgas, las cuales fueron crecidas en 2 l de medio “f” (Guillard y Ryther, 1962), adicionando silicatos a los cultivos de diatomeas. Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente de $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y a una irradiancia de $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A partir de estos cultivos se tomaron muestras de 300 ml en la fase estacionaria a los 5 y 7 días de cultivo. Estas muestras fueron centrifugadas a 2465 g durante 10 minutos a 4°C y el paquete celular y medio de cultivo de cada cepa fue liofilizado. Las muestras liofilizadas fueron almacenadas a -20°C . En este estudio se trabajó con las muestras de biomasa y sobrenadante liofilizados de las 28 especies, que incluyen 12 especies de cianobacterias y 16 de microalgas (Tabla 1) todas provenientes de las colecciones personales de la Dra. Elizabeth Ponce-Rivas y de la Dra. M. del Pilar Sánchez-Saavedra pertenecientes a los Departamentos de Biotecnología Marina y de Acuicultura del CICESE.

Tabla 1. Cepas de microalgas y cianobacterias de las que se obtuvieron muestras de biomasa y sobrenadante liofilizadas

Bacillariophyceas bentónicas	Rhodophyceas
<i>Amphiprora paludosa</i> var. <i>hyalina</i>	<i>Porphyridium cruentum</i>
<i>Nitzschia frustulum</i> var. <i>perminuta</i>	<i>Rhodomonas salina</i>
<i>Nitzschia thermalis</i> var. <i>minor</i>	
<i>Navicula incerta</i>	
Bacillariophyceas planctónicas	Cyanophyceas
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Unicelulares
<i>Chaetoceros muelleri</i>	E6-VZ
<i>Chaetoceros</i> sp.	<i>Synechocystis</i> sp.
<i>Skeletonema costatum</i>	<i>Synechococcus elongatus</i>
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	
Chlorophyceas	Filamentosas
<i>Dunaliella bardawil</i>	E10-VZ
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	E2(1C)-VZ
	E6-GN
	E8(12A)-VZ
	EC-VZ
Eustigmatophyceas	<i>Oscillatoria</i> sp. cepa 1
<i>Nannochloropsis oculata</i>	<i>Oscillatoria</i> sp. cepa 1 (globosa)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	<i>Oscillatoria</i> sp. cepa 4
Prasinophyceas	<i>Spirulina maxima</i>
<i>Tetraselmis suecica</i>	
Primnesiophyceas	
<i>Isochrysis</i> sp.	

6.2. Obtención de la curvas de crecimiento de los microorganismos patógenos de prueba

En este trabajo se utilizaron como microorganismos patógenos de prueba la bacteria Gram-positiva *Bacillus subtilis* (cepa W. Fenical 1998¹), las bacterias Gram-negativas *Escherichia coli* (cepa W. Fenical 1998) y *Pseudomonas aeruginosa* (cepa UABC²) y la levadura *Candida albicans* (cepa W. Fenical 1998).

Se tomó una azada de las cepas de *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* (mantenidas en stock con glicerol a -80°C) y se realizó la siembra por el método de estría cruzada, sobre una caja con 20 ml de agar Müeller-Hinton (1.2% de agar) y posteriormente se incubó a 37°C durante 24 h.

Una vez transcurrido este tiempo, se tomaron de una a tres colonias aisladas, las cuales se utilizaron para inocular un tubo con 5 ml de medio Müeller-Hinton (MH). Este, tubo fue incubado durante 12 h a 200 rpm. Con este pre-inóculo se sembraron 50 ml de medio MH a una densidad óptica de 600 nm (DO₆₀₀) de 0.1, el cual fue incubado bajo las mismas condiciones. La DO₆₀₀ del cultivo fue medida cada hora durante 12 h y con estos datos se elaboraron las curvas de crecimiento.

Los valores de DO₆₀₀ correspondientes a la fase exponencial de las curvas de crecimiento de cada microorganismo fueron transformados a escala semilogarítmica y se calculó la constante de velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (g) utilizando las siguientes fórmulas:

$$\mu = (2.303 * (\log_{10} DO_{600f} - \log_{10} DO_{600i})) / (t_f - t_i) \quad (1)$$

$$g = \ln 2 / \mu \quad (2)$$

¹ Scripps Institution of Oceanography, UCSD (Center for Marine Biotechnology and Biomedicine).

² Universidad Autónoma de Baja California.

en donde DO_{600f} es la densidad óptica final; DO_{600i} , la densidad óptica inicial; t_f , el tiempo final y t_i , el tiempo inicial (Neidhardt *et al.*, 1990). Las DO_{600} así como los tiempos fueron establecidas al inicio y término de dicha fase.

6.3. Selección de la concentración de dimetil sulfóxido (C_2H_6SO , DMSO) inocua para los microorganismos prueba y selección de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del antibiótico control

La sensibilidad de *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* al DMSO fue evaluada por triplicado en ensayos utilizando placas de 96 pozos (Corning Inc., Costar 3595).

El pre-inóculo se obtuvo como se describe en el apartado anterior y a la mitad de la fase exponencial de crecimiento de los microorganismos se tomó una alícuota para ajustar un tubo con 5 ml de medio MH para obtener una turbidez ópticamente comparable al 0.5 de la escala de McFarland (suspensión con aprox. $1.5-2 \times 10^8$ UFC ml^{-1} de *E. coli* ATCC 25922, ver Anexos); lo que nos permitió normalizar la densidad del inóculo para este ensayo. A partir de este cultivo se realizó una dilución 1:1000, para alcanzar una concentración final de células de $1.5-2 \times 10^5$ UFC ml^{-1} (Bou, 2007). Con esta concentración celular se realizaron los ensayos para evaluar a qué concentraciones resultaba tóxico el DMSO, así como la búsqueda de la MIC del imipenem, que fue utilizado como antibiótico (control positivo) en los ensayos de antibiosis, dado que es un antibiótico de amplio espectro que ha sido utilizado con buenos resultados en trabajos previos (Torres-Ariño, 2001).

El diseño experimental para evaluar el efecto del DMSO sobre cada uno de los microorganismos patógenos de prueba se muestra en la Figura 1.

Las filas A y B sirvieron como control negativo del crecimiento del microorganismo y para evaluar el posible efecto del DMSO sobre la absorbancia del medio de cultivo MH. A los pozos A2-A12 y B2-B12 se les adicionaron 100 μl de medio MH. Al pozo A1 se le agregaron 180 μl del medio MH más 20 μl de agua desionizada estéril (H_2O_d) y al pozo B1 se le adicionaron 180 μl del medio MH más 20 μl de DMSO al 99.9%.

Las filas C, D y E se utilizaron como control positivo del crecimiento de cada uno de los microorganismos prueba, cuya concentración fue aproximadamente de $1.5 \cdot 10^5$ UFC ml^{-1} . Los pozos C1, D1 y E1 se inocularon con 180 μl del cultivo de cada microorganismo más 20 μl de H_2O_d ; el resto de los pozos de estas filas, se inocularon con 100 μl del cultivo de cada microorganismo.

Las filas F, G y H se utilizaron para evaluar la toxicidad del DMSO. Los pozos de la primera columna (F1, G1 y H1) se inocularon con 180 μl del cultivo de los microorganismos más 20 μl de DMSO al 99.9%. Al resto de los pozos se agregaron 100 μl del cultivo de cada microorganismo.

A partir de los pozos de la primera columna (A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1 y H1) se realizaron diluciones seriadas. Para ello se mezclaron completamente las muestras de estos pozos empleando una pipeta multicanal y se tomaron 100 μl de dichas muestras, los cuales fueron transferidos a los pozos de la siguiente columna y así sucesivamente hasta llegar a la columna 12. Los 100 μl colectados de esta columna fueron descartados.

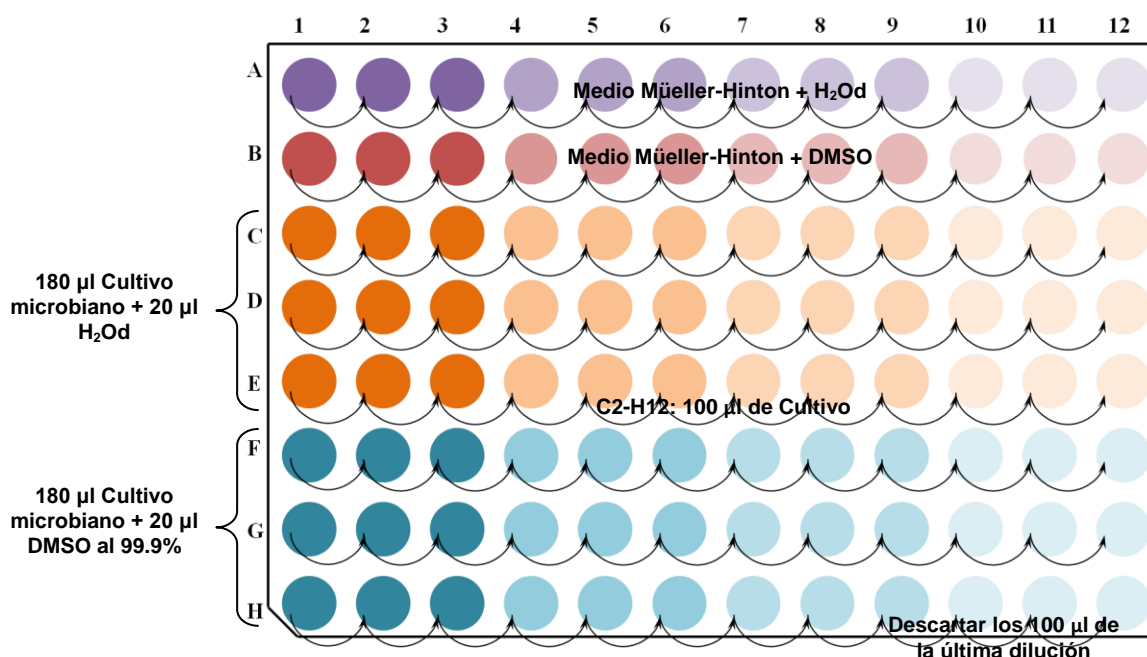


Figura 1. Diseño experimental para la selección de la concentración de DMSO inócua para el panel de microorganismos patógenos.

El diseño experimental para la búsqueda de la MIC del imipenem ($C_{12}H_{17}N_3O_4S \cdot H_2O$) para cada microorganismo se muestra en la Figura 2. Este diseño es similar al del DMSO, sólo que en este caso las filas F, G y H se utilizaron para evaluar la acción del antibiótico sobre los cultivos de los microorganismos. Los pozos de la primera columna (F1, G1 y H1) se inocularon con 180 µl del cultivo de los microorganismos más 20 µl de imipenem a una concentración inicial de $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$. El resto de los pozos se inocularon con 100 µl del cultivo de cada microorganismo. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas a partir de los pozos de la primera columna. Los 100 µl recolectados de la última columna fueron descartados.

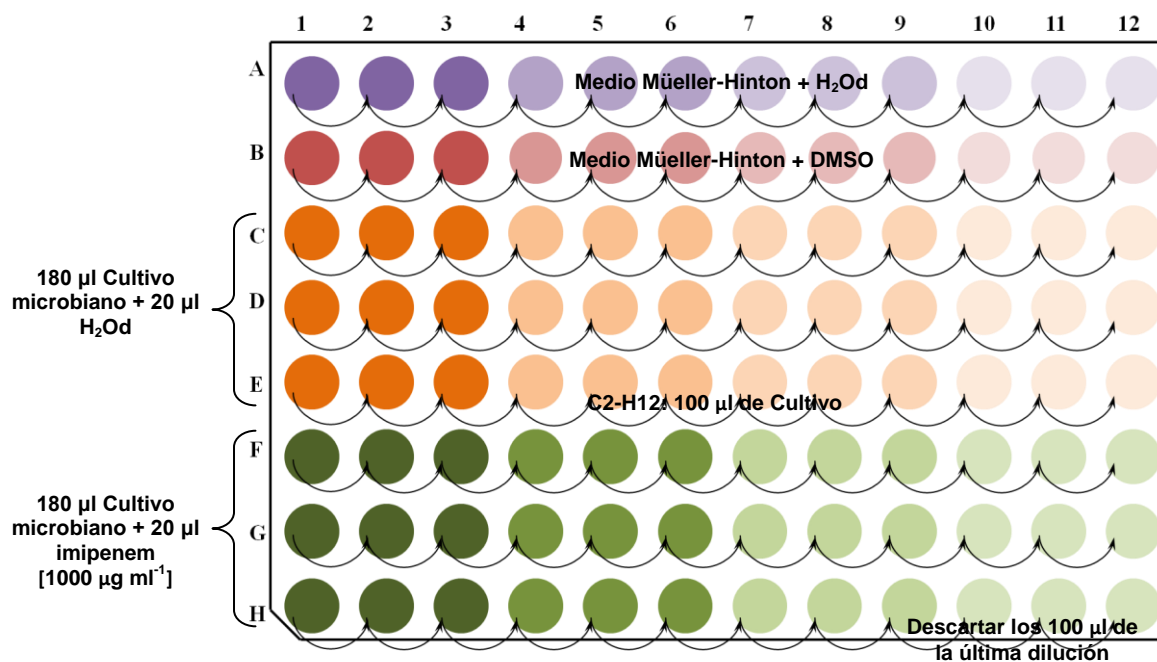


Figura 2. Diseño experimental para la selección de la MIC del imipenem para el panel de microorganismos patógenos.

Tanto para el ensayo del DMSO como para el del imipenem se utilizó una placa de 96 pozos por cada microorganismo. Una vez finalizadas las diluciones, las placas fueron tapadas y colocadas en incubación a 37°C; posteriormente a las 24 h se midió la DO₆₀₀ empleando un contador de placas (Beckman Coulter, AD200). Con los resultados obtenidos de DO₆₀₀, se elaboraron las curvas de dosis:respuesta para el DMSO y para el imipenem.

6.4. Obtención de extractos

Las muestras colectadas en los días 5 y 7 de la fase estacionaria de los cultivos de microalgas y cianobacterias fueron unidas para obtener mayor cantidad de muestra para realizar las extracciones. Cada muestra de biomasa liofilizada se obtuvo a partir de 300 ml de medio de cultivo recuperado por día de cosecha y cada muestra de sobrenadante liofilizada se originó a partir de 50 ml de medio "f" recuperado por día de cosecha.

Previo a realizar las extracciones, las muestras liofilizadas de los paquetes celulares y de los sobrenadantes de los cultivos de microalgas y cianobacterias fueron pesadas. Dichos valores junto con los pesos de los extractos permitieron calcular el porcentaje de rendimiento de cada una de las extracciones.

Las dos muestras liofilizadas de los sobrenadantes del medio de cultivo "f" se juntaron y resuspendieron en 60 ml de agua desionizada estéril y posteriormente fueron transferidas a un embudo de separación, donde se adicionaron 50 ml de cloroformo. Las fases se mezclaron y se recuperó la fase inferior (clorofórmica) en un recipiente aparte. Nuevamente se adicionó a la fase acuosa un segundo volumen de cloroformo y se volvió a recuperar la fase clorofórmica, la cual se juntó con el volumen anteriormente recuperado.

A continuación, a la fase acuosa se le adicionaron 50 ml de diclorometano y se realizó la extracción con este solvente siguiendo los pasos empleados con el cloroformo. Las dos fracciones de diclorometano se juntaron y la fase acuosa fue recuperada.

Posteriormente, las dos muestras liofilizadas de biomasa se juntaron y resuspendieron en 50 ml de agua desionizada estéril y fueron tratadas bajo las mismas condiciones que las muestras de los sobrenadantes.

Los extractos obtenidos a partir de cloroformo y diclorometano se secaron en una estufa con celdas de aire de recirculación (Blue M, 0V-560A-2), a una temperatura de 40°C en viales (Wheaton, 224982) sin su tapa durante 12 horas y los extractos de la fase acuosa se liofilizaron. Los extractos secos se pesaron utilizando una balanza analítica (Mettler Toledo, MS105) y se almacenaron hasta su utilización a -20°C.

De esta manera se obtuvieron tres extractos por muestra con diferentes polaridades, cloroformo (punto de ebullición 61°C) que tiene afinidad por esteroides, ácidos grasos y otros compuestos no polares; diclorometano (punto de ebullición 40°C) el cual presenta afinidad por cualquier otro compuesto menos grasas, y agua que permite solubilizar péptidos y sales.

De acuerdo a Ramirez y Marin (2009), la concentración a evaluar de extracto no debe de exceder 1 mg ml⁻¹, por ello, se decidió que las muestras fueran resuspendidas según su naturaleza en un volumen de agua desionizada estéril o en un volumen de DMSO al 0.2% estéril, que calculado permitiera obtener “soluciones madre” con una concentración final de 10 mg ml⁻¹. Estas soluciones permitieron tener una concentración inicial de extracto de 1 mg ml⁻¹ en el ensayo de microdilución.

Los primeros extractos orgánicos en resuspendirse fueron los provenientes de la fase clorofórmica de las muestras de los sobrenadantes. Al adicionar el volumen previamente calculado de DMSO al 0.2%, se observó que la película oleaginosa adherida al fondo de los viales no se solubilizaba; por lo que se decidió adicionar DMSO al 99.9%, modificando la concentración final de extracto en estas soluciones (a 8.7 mg ml⁻¹), así como la concentración de DMSO (1.7%).

Para favorecer la solubilización de los sucesivos extractos orgánicos se decidió utilizar una solución de DMSO al 1.3% estéril y aplicar pulsos de 30 s (durante

máximo 3 minutos, con una amplitud de onda de 20 Mhz) con un ultrasonificador de varilla (Ultrasonic Processor), manteniendo las muestras en hielo, ayudando con ello a resuspender los componentes presentes en los extractos.

A partir de las “soluciones madre” se realizaron diluciones para alcanzar una concentración final de extracto de 1 mg ml^{-1} , las cuales se requerían para realizar el ensayo de difusión en placa.

6.5. Susceptibilidad de *B. subtilis* a diferentes concentraciones de DMSO empleando filtros de papel

Se realizó un ensayo para la selección de la concentración inocua de DMSO para *B. subtilis* utilizando filtros de papel de 6 mm de diámetro (ϕ) impregnados con soluciones estériles de DMSO a concentraciones de 99.9, 2.5 y 0.2%; así mismo se probaron dos volúmenes para impregnar los filtros de papel (20 y 30 μl) y se definió el tiempo mínimo de secado de los mismos.

Para ello, se reactivó a *B. subtilis* como se describe en la sección 6.2. y a la mitad de la fase exponencial de crecimiento de este microorganismo se tomó una alícuota para ajustar un tubo con 5 ml de medio MH para obtener una turbidez ópticamente comparable al 0.5 de la escala de McFarland.

Una vez ajustada la turbidez de la suspensión, se sumergió un hisopo estéril girándose varias veces y se sacudió para eliminar el exceso de inóculo, posteriormente con este hisopo se sembró la superficie seca de una placa de agar MH.

Las soluciones a diferentes concentraciones de DMSO se mezclaron utilizando vórtex y se tomaron volúmenes de 20 y 30 μl de cada solución y se colocaron en

los filtros de papel estériles. Una vez impregnados con la muestra correspondiente, los filtros se dejaron secar bajo una campana de flujo laminar.

Cada filtro fue presionado contra la superficie del agar para asegurar un contacto completo. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h y finalizado este tiempo, se observó la presencia o ausencia de halos de inhibición, los cuales se midieron incluyendo el diámetro del filtro de papel.

El tratamiento control para este experimento fueron filtros de papel impregnados con agua desionizada estéril. Cada concentración de DMSO, así como el control fueron probados por triplicado.

6.6. Bioensayos con microorganismos prueba (Método de Kirby-Bauer o de difusión en placa)

Los ensayos de antibiosis se realizaron empleando el método de difusión en placa o Método de Kirby-Bauer (Lalitha, 2004).

Cada microorganismo fue reactivado, tomando una azada fresca de cada una de las cepas y se realizó la siembra sobre una caja Petri con 20 ml de agar MH por el método de estría cruzada, a continuación se incubaron a 37°C durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, se tomaron de una a tres colonias aisladas y se sembraron en 5 ml de medio MH y se incubaron durante 12 h a 200 rpm. Con este pre-inóculo se inocularon 50 ml de medio MH a una DO_{600} de 0.1, el cual fue incubado bajo las mismas condiciones. A la mitad de la fase exponencial de crecimiento de cada uno de los microorganismos se tomó una alícuota para ajustar un tubo con 5 ml de medio MH para obtener una turbidez ópticamente comparable al 0.5 de la escala de McFarland.

Una vez ajustada la turbidez de la suspensión, se sumergió un hisopo estéril (PROTEC de 15 cm) girándose varias veces y se sacudió para eliminar el exceso de inóculo, posteriormente con este hisopo se sembró la superficie seca de una placa de agar MH. La placa se dejó abierta de 1 a 3 minutos para permitir que cualquier exceso de humedad de la superficie fuera absorbido antes de aplicar los filtros impregnados con los extractos.

Los extractos previamente congelados a -20°C fueron descongelados durante aproximadamente 20 min a temperatura ambiente y posteriormente se mezclaron mediante vórtex. Se tomaron $30\ \mu\text{l}$ de cada extracto a una concentración de $1\ \text{mg}\ \text{ml}^{-1}$ y se colocaron en filtros de papel de 6 mm de diámetro estériles (Whatman 2017-006). Una vez impregnados con la muestra correspondiente, los filtros se dejaron secar durante 1 h bajo una campana de flujo laminar.

La batería de filtros conteniendo cada extracto fue distribuida sobre la superficie de las placas de agar inoculadas previamente con cada uno de los cuatro microorganismos prueba por triplicado (Figura 3).

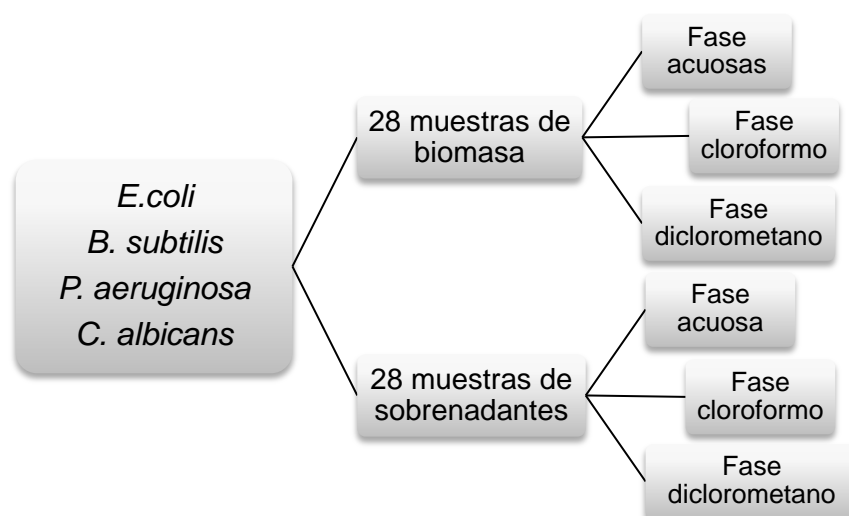


Figura 3. Extractos analizados en los ensayos de antibiosis.

Cada filtro fue presionado contra la superficie del agar para asegurar un contacto completo utilizando pinzas de disección estériles. Los filtros fueron distribuidos uniformemente, cinco por cada caja Petri. Las placas fueron invertidas y se colocaron a 4°C durante 2 h para permitir una mejor difusión de los componentes presentes en los extractos. Posterior a esto, las placas se incubaron a 37°C durante 24 h en una incubadora de mesa (Shel Lab, 1510t). Finalizado este tiempo, se revisaron las placas a contra luz y se observó la presencia o ausencia de halos de inhibición.

Para este experimento, se utilizaron filtros de papel impregnados con 30 μl de imipenem (Torres-Ariño, 2001) a concentraciones de 204, 68 y 17 $\mu\text{g ml}^{-1}$, como tratamiento control positivo de la inhibición del crecimiento de los microorganismos prueba. Estas soluciones de antibiótico se repartieron en alícuotas de 100 μl , las cuales se fueron descongelando conforme se utilizaron a lo largo del ensayo. Como controles negativos se emplearon filtros de papel impregnados con 30 μl de solución de DMSO al 1.3%, agua de mar liofilizada (1 mg ml^{-1}), medio "f" liofilizado (1 mg ml^{-1}) y agua desionizada estéril. Cada extracto y control fueron probados por triplicado.

Los diámetros de las zonas de inhibición completa (a juzgar por el ojo desnudo) se midieron (incluyendo el diámetro del filtro) empleando una regla y colocándola en la parte posterior de la placa de Petri invertida y a contra luz. Los halos de inhibición se tomaron como un indicador de la presencia de al menos un metabolito secundario con actividad antimicrobiana.

6.7. Bioensayos con microorganismos prueba (Método de microdilución)

Una vez seleccionados los extractos que dieron positivos en el ensayo de difusión en placa, estos fueron probados utilizando el método de microdilución (Lalitha, 2004; Bou, 2007); ya que utilizando este método se aumenta la sensibilidad del

efecto antimicrobiano para cantidades pequeñas, lo cual es importante comprobar cuando se trabaja con productos naturales (Ramirez y Marin, 2009).

La sensibilidad de los microorganismos patógenos de prueba a los extractos de cianobacterias y microalgas fue evaluada en ensayos utilizando placas de 96 pozos por triplicado.

El pre-inóculo se obtuvo como se describe en el apartado 6.2. y a la mitad de la fase exponencial de crecimiento de los microorganismos se tomó una alícuota para ajustar un tubo con 5 ml de medio MH para obtener una turbidez ópticamente comparable al 0.5 de la escala de McFarland (suspensión con aproximadamente $1.5-2 \times 10^8$ UFC ml^{-1} de *E. coli* ATCC 25922). A partir de este cultivo se realizó una dilución 1:1000, para alcanzar una concentración final de células de $1.5-2 \times 10^5$ UFC ml^{-1} (Bou, 2007).

El diseño experimental para evaluar el efecto de la actividad antimicrobiana de los extractos sobre cada uno de los microorganismos patógenos de prueba se muestra en la Figura 4. Los extractos previamente congelados a -20°C fueron descongelados durante 20 min a temperatura ambiente y posteriormente se mezclaron mediante vórtex. La fila A sirvió como control negativo del crecimiento de los microorganismos; al pozo A1 se le agregaron 180 μl del medio MH más 20 μl de H_2O o DMSO al 1.3% y a los pozos A2-A12 se les adicionaron 100 μl de medio MH.

La fila H sirvió como control positivo de la inhibición del crecimiento de los microorganismos. Al pozo H1 se le agregaron 180 μl del cultivo microbiano más 20 μl de imipenem a una concentración inicial de $680 \mu\text{g ml}^{-1}$ y los pozos H2-H12 se inocularon con 100 μl del cultivo.

Las filas B, C y D se utilizaron como control positivo del crecimiento de cada uno de los microorganismos prueba, cuya concentración fue aproximadamente de $1.5 \cdot 10^5$ UFC ml^{-1} . Los pozos B1, C1 y D1 fueron inoculados con 180 μl del cultivo de cada microorganismo más 20 μl de H_2O o DMSO al 1.3% (según la naturaleza del extracto a probar). El resto de los pozos de estas filas fueron inoculados con 100 μl del cultivo de cada microorganismo.

Las filas E, F y G se utilizaron para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de cianobacterias y microalgas. Los pozos de la primera columna (E1, F1 y G1), fueron inoculados con 180 μl del cultivo de los microorganismos más 20 μl de cada extracto a una concentración inicial de 10 mg ml^{-1} . El resto de los pozos fueron inoculados con 100 μl del cultivo de cada microorganismo.

A partir de los pozos de la primera columna se realizaron diluciones seriadas. Para ello se mezclaron completamente las muestras de estos pozos empleando una pipeta multicanal y se tomaron 100 μl de dichas muestras, los cuales fueron transferidos a los pozos de la siguiente columna y así sucesivamente hasta llegar a la última columna, los 100 μl recolectados de esta columna fueron descartados.

Durante el transcurso de este ensayo se utilizó la misma solución de imipenem (concentración inicial de 680 $\mu\text{g ml}^{-1}$), la cual se mantuvo congelada a -20°C y para su utilización se descongeló a temperatura ambiente.

Adicionalmente se colocó una placa con el cultivo de los microorganismos más agua de mar filtrada y medio "f", debido a que algunos de los extractos con actividad antimicrobiana provenían de la fase acuosa de muestras de sobrenadantes. Esta placa nos permitiría conocer si existía algún efecto de inhibición sobre el crecimiento de los microorganismos por parte de las sales presentes en estas muestras.

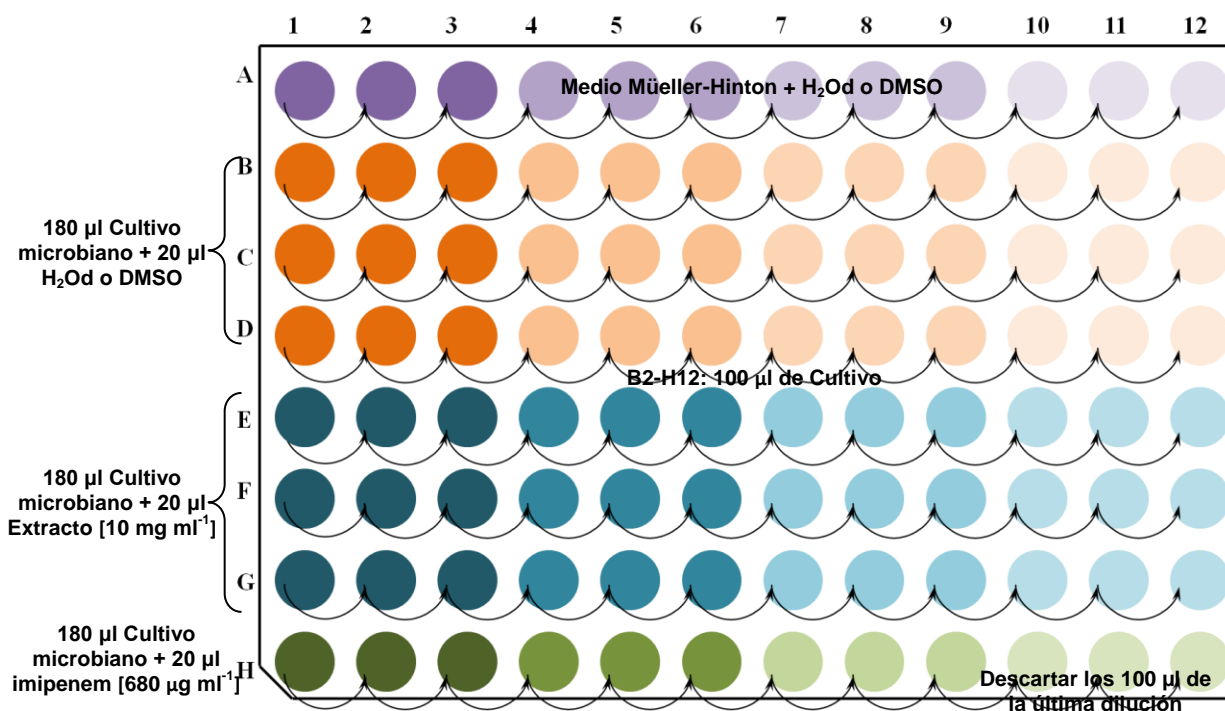


Figura 4. Método de microdilución utilizando extractos de cianobacterias y microalgas.

Se utilizó una placa de 96 pozos por cada extracto y por microorganismo. Una vez finalizadas las diluciones, las placas fueron tapadas y colocadas en incubación a 37°C; posteriormente a las 24 h se midió la DO_{600} empleando un contador de placas (Beckman Coulter, AD200). Con los resultados obtenidos de DO_{600} , se elaboraron las curvas de dosis:respuesta para los extractos.

6.8. Ensayos de biotoxicidad empleando como modelo a *Artemia franciscana*

6.8.1. Eclosión de quistes de *A. franciscana*

Para evaluar la posible biotoxicidad de los extractos que presentaron actividad antimicrobiana en los ensayos previos, se llevó a cabo un ensayo utilizando nauplios de *A. franciscana*. Primero se procedió a realizar la eclosión de los quistes. Para ello, se pesaron 50 mg de quistes, los cuales se hidrataron durante 1 h en agua de mar filtrada (H_2O_m). Posteriormente, los quistes fueron colocados en

una solución de hipoclorito de sodio al 3% hasta tomar una coloración rojiza (~ 5 min) y se enjuagaron con agua potable hasta eliminar restos de la solución de hipoclorito de sodio.

Los quistes fueron colocados en un tubo cónico con aproximadamente 1000 ml de H₂O_m y se mantuvieron a 25±1°C e iluminación constante de 60 μE m⁻² s⁻¹, con aireación profusa durante 24 h. Una vez que los quistes eclosionaron, la aireación fue interrumpida y los nauplios fueron colectados por fototropismo y se utilizaron en un periodo máximo de 6 horas.

6.8.2. Evaluación de la biotoxicidad de extractos con actividad antimicrobiana

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pozos con tapa, iguales a los utilizados en los ensayos de antibiosis, siguiendo la metodología de McLaughlin (1991) modificada.

El ensayo consistió en colocar entre 8-12 nauplios por pozo en un volumen final de 200 μl (180 μl de H₂O_m y 20 μl de extracto o de control).

El rango recomendado para la determinación de la Concentración Letal Media a las 24 horas (LC₅₀-24 h) en sustancias químicas es de 10 000, 1000, 100, 10, 1.0 y 0.1 mg l⁻¹. La LC₅₀-24 h se define como la concentración de un material tóxico letal para el 50% de los organismos de prueba (Vanhaecke *et al.*, 1981). Por lo que en todos los casos, a partir de los extractos de microalgas y cianobacterias que resultaron con actividad antimicrobiana se prepararon alícuotas a distintas concentraciones (2500, 1000, 500, 250, 100, 10, 1.0 y 0.1 mg l⁻¹). Adicionalmente, se colocó un control de dodecilsulfato de sodio (SDS) a cuatro concentraciones finales: 10, 13.5, 18 y 24 mg l⁻¹ para evaluar la calidad de los nauplios de acuerdo a Vanhaecke *et al.* (1981). En todos los casos las concentraciones fueron

evaluadas por triplicado. Finalmente se colocó un control a base de H₂O_d y de DMSO al 1.3%.

Las placas fueron mantenidas a las mismas condiciones experimentales utilizadas para la eclosión de los quistes y se evaluó la mortalidad de los nauplios mediante conteos en un microscopio estereoscópico (Olympus, SZX7) a las 24 horas de iniciado el experimento. Con los resultados obtenidos se elaboraron curvas de porcentaje de mortalidad para los extractos. Los valores de LC₅₀-24 h se corroboraron utilizando gráficas semilogarítmicas en el eje de las abcisas de acuerdo a Vanhaecke *et al.* (1981).

6.9. Análisis estadístico de los datos

A los datos obtenidos en los ensayos del efecto de la concentración de DMSO y búsqueda de la MIC del imipenem se les aplicó una prueba estadística *t*-Student para cada una de las concentraciones.

Los datos positivos en cuanto a actividad antimicrobiana obtenidos a partir del ensayo de difusión en placa (Método de Kirby-Bauer) cumplieron con los principios de normalidad y homocedasticidad, por lo que se utilizó un análisis de varianza múltiple o ANOVA factorial para evaluar las posibles diferencias entre tratamientos. En los casos donde se encontraron diferencias significativas, se utilizó una prueba *a posteriori* de Tukey.

Los datos obtenidos en los ensayos de microdilución (antibiosis) y biotoxicidad fueron analizados utilizando como prueba estadística una *t*-Student para cada una de las concentraciones de extracto probado.

Todos los análisis estadísticos se elaboraron utilizando el programa STATISTICA® versión 7.0 (Stat Soft Inc., 2004) con un nivel de significancia de 0.05.

7. Resultados

7.1. Obtención de las curvas de crecimiento de los microorganismos patógenos de prueba

Debido a que los estudios de sensibilidad a agentes antimicrobianos se basan en exponer a un determinado número de microorganismos procedentes de un mismo inóculo a la acción de diferentes concentraciones de los agentes antimicrobianos, estos resultados pueden afectarse por la edad y turbidez del inóculo bacteriano. Por tal motivo, es importante conocer las curvas de crecimiento de los microorganismos de prueba (patógenos) para optimizar la eficiencia en los ensayos de antibiosis.

En todos los ensayos para obtener las curvas de crecimiento se tomaron muestras durante cada hora para medir la DO_{600} de los cultivos y se determinó que el volumen retirado de los cultivos no fuera mayor al 18% del volumen total del cultivo.

Los datos obtenidos de las cinéticas de crecimiento de los microorganismos patógenos de prueba se muestran en la Figura 5. Como se puede observar, los cultivos de los diferentes microorganismos iniciaron su crecimiento a una densidad óptica aproximada de 0.1 y tardaron entre 8 y 10 horas en alcanzar la fase estacionaria de crecimiento.

En todas las curvas de crecimiento se aprecia la fase de adaptación o de latencia (de 0 a 2 h), la fase exponencial (de 2 a 10 h, dependiendo de cada microorganismo), la fase estacionaria (de 8 a 10 h, dependiendo del microorganismo) y en algunos casos como en el de *B. subtilis* y *C. albicans* incluso

pudo apreciarse una disminución en la DO_{600} a las 12 h, lo cual nos indicó que el cultivo entró a la fase de muerte celular.

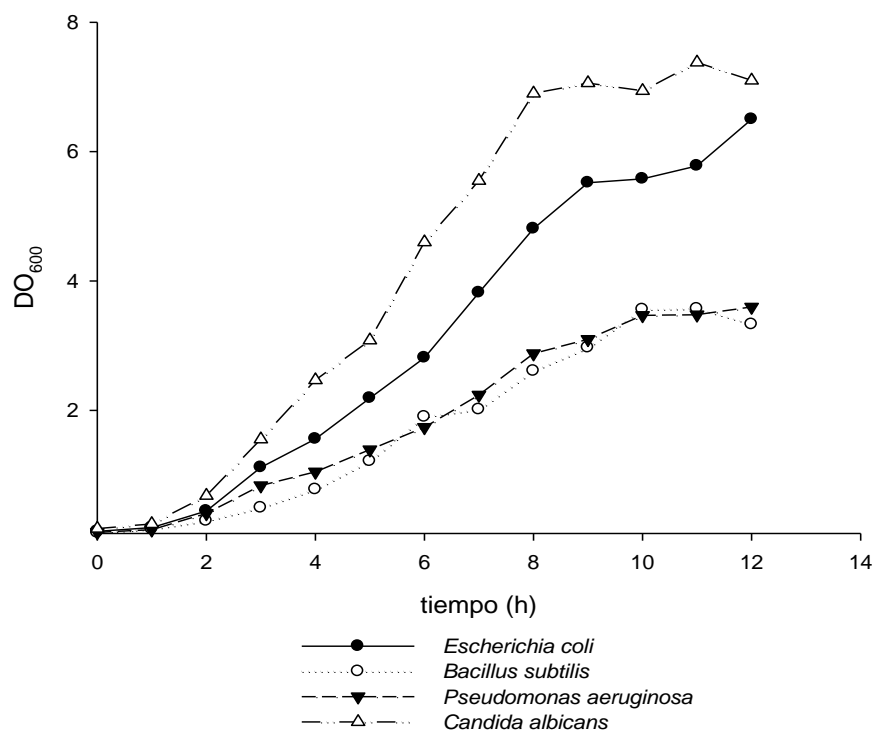


Figura 5. Cinéticas de crecimiento de los microorganismos patógenos de prueba.

Con los datos de la fase exponencial de crecimiento, se procedió a realizar el cálculo para la obtención de la velocidad de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (g , Tabla 2). Como se puede observar, *E. coli* y *C. albicans* son los microorganismos que alcanzaron mayor crecimiento celular, ya que sus tiempos de duplicación fueron cortos. *B. subtilis* y *P. aeruginosa* presentaron una velocidad de crecimiento baja, con tiempos de duplicación mayores que *E. coli* y *C. albicans* en 1.2 y 1.4 veces.

Tabla 2. Constante de velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (g) de microorganismos prueba

Microorganismo	μ (h^{-1})	g (h)	Mitad de la fase exponencial (h)
<i>Escherichia coli</i>	0.359	1.930	5-6
<i>Bacillus subtilis</i>	0.313	2.217	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.268	2.590	6
<i>Candida albicans</i>	0.386	1.797	5

Con el fin de homogenizar el tipo de inóculo de los microorganismos prueba para futuros experimentos y evitar variantes atípicas, se decidió utilizar cada cultivo cuando éste se encontrara a la mitad de la fase exponencial de crecimiento, la cual varía de 5 a 6 horas, dependiendo del microorganismo.

7.2. Selección de la concentración de Dimetil sulfóxido (DMSO) inocua para los microorganismos prueba

González-Davis *et al.* (2012) utilizaron DMSO para solubilizar extractos orgánicos obtenidos a partir de biomasa de microalgas y cianobacterias. Debido a que este solvente mostró tener un efecto inhibitorio sobre el cultivo de *Vibrio campbellii* M1, se decidió realizar un ensayo para elegir la concentración adecuada de DMSO para resuspender los extractos obtenidos a partir de biomasa y sobrenadante de cultivos de cianobacterias y microalgas; eliminando así el efecto de antibiosis que pudiera presentarse con la utilización de este solvente sobre el crecimiento de los microorganismos prueba.

Los cultivos de *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* se sometieron a un gradiente de concentraciones utilizando inicialmente DMSO al 9.99%. Los resultados de este ensayo se muestran de la Figura 6 a la 9.

En la Figura 6, se muestran los resultados del efecto de la concentración del DMSO sobre el cultivo de *E. coli*. En todas las concentraciones probadas del solvente en este ensayo, los valores promedio obtenidos de DO_{600} del cultivo de *E. coli* más el solvente, no presentaron diferencias significativas ($P>0.05$), comparadas contra el cultivo más agua destilada estéril, por lo que, el DMSO no presentó efecto inhibitorio sobre el cultivo de *E. coli*. Así mismo en todos los ensayos con los microorganismos prueba, se utilizó como control al medio MH con diferentes concentraciones de DMSO, lo cual permitió observar si existía variación en la absorbancia del medio de cultivo a 600 nm influenciada por el solvente; sin embargo, la variación de la absorbancia comparada con el medio con agua desionizada estéril no fue significativa ($P>0.05$). La adición de DMSO no modificó la absorbancia mostrada por el medio MH.

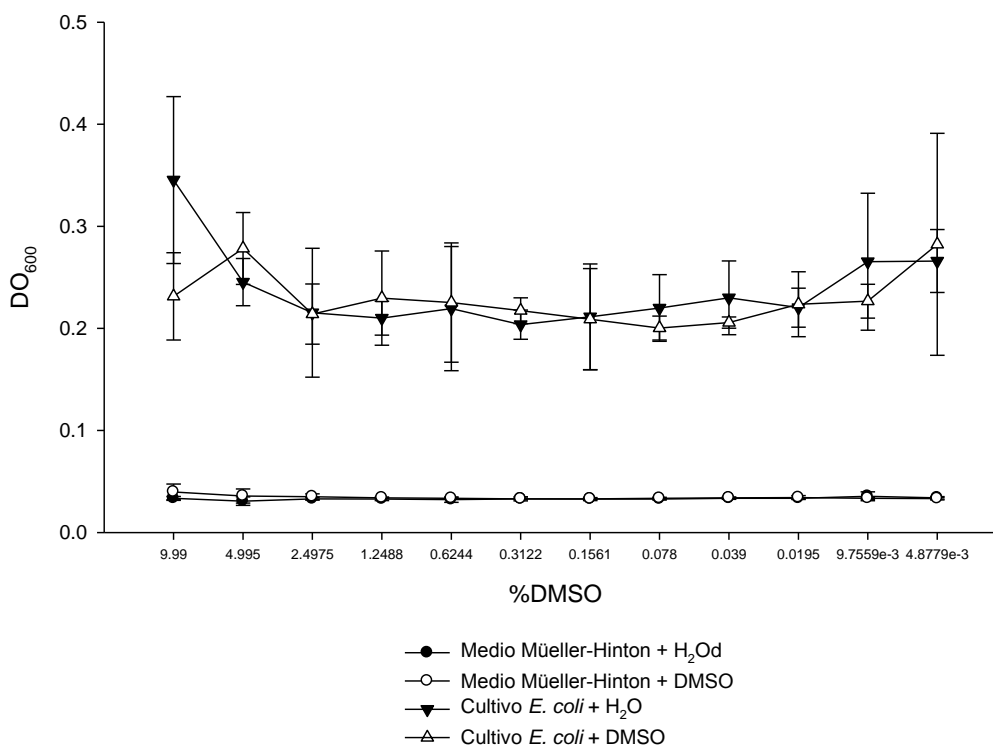


Figura 6. Efecto de la concentración del DMSO sobre el cultivo de *E. coli*. Las barras indican la desviación estándar.

En cuanto al efecto de la concentración del DMSO sobre el cultivo de *B. subtilis*, los valores promedio de DO_{600} del cultivo tratado con 9.99% y hasta 2.50% de este solvente, presentaron diferencias muy altamente significativas ($P < 0.001$) comparadas con los valores promedio del cultivo con agua desionizada estéril (Figura 7). Las concentraciones de 1.25% y 0.62% de DMSO presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto al control y a partir de esta última concentración se da un punto de inflexión en el cual al comparar la DO_{600} del control y del cultivo con DMSO, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$). Por lo que dentro del panel de microorganismos patógenos de prueba *B. subtilis* fue el más sensible a la acción bactericida del DMSO, teniendo un intervalo de concentraciones del 9.99% al 0.62% de este solvente que afecta el crecimiento de esta bacteria Gram-positiva.

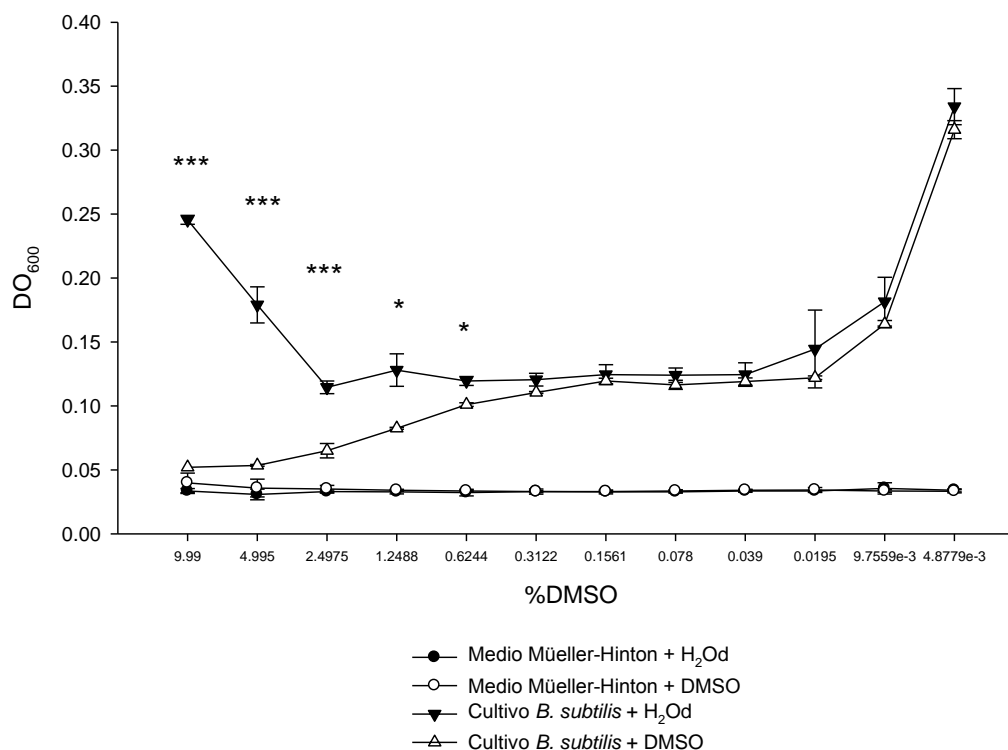


Figura 7. Efecto de la concentración del DMSO sobre el cultivo de *B. subtilis*. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.001$:*; $P < 0.05$:*.**

La Figura 8 muestra los resultados del efecto de la concentración del DMSO sobre el cultivo de *P. aeruginosa*. Los valores promedio de DO_{600} obtenidos al comparar el cultivo con 9.99% de DMSO presentaron diferencias muy altamente significativas ($P < 0.001$) con respecto a los valores promedio de DO_{600} del cultivo de *P. aeruginosa* tratados únicamente con agua desionizada estéril (control). A partir de esta concentración se da un punto de inflexión, ya que no se presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) comparando las DO_{600} del control con los valores del cultivo con solvente, no siendo nocivas las concentraciones más bajas de DMSO para este microorganismo.

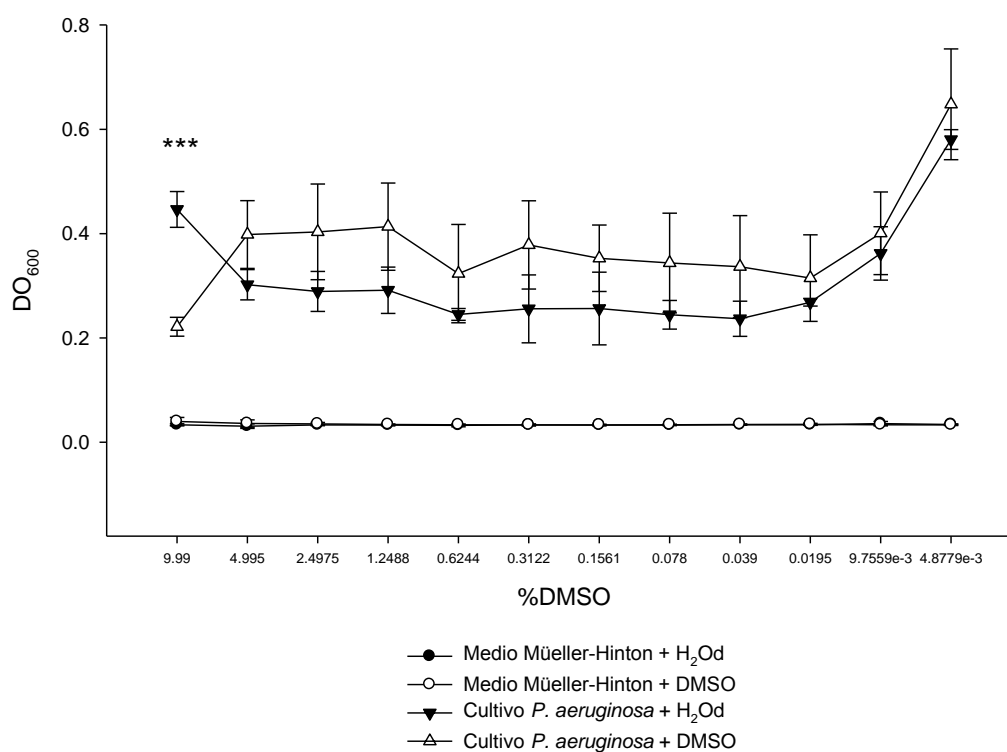


Figura 8. Efecto de la concentración del DMSO sobre el cultivo de *P. aeruginosa*. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.001$:*.**

Los resultados del efecto de la concentración del DMSO sobre el cultivo de *C. albicans* se muestran en la Figura 9. En este ensayo todas las concentraciones probadas del DMSO sobre el cultivo de *C. albicans*, no presentaron diferencias significativas ($P>0.05$) comparadas con los valores promedio de DO_{600} del cultivo con agua destilada estéril, por lo que bajo estas condiciones, el DMSO no afectó el cultivo de la levadura en ninguna de las concentraciones probadas.

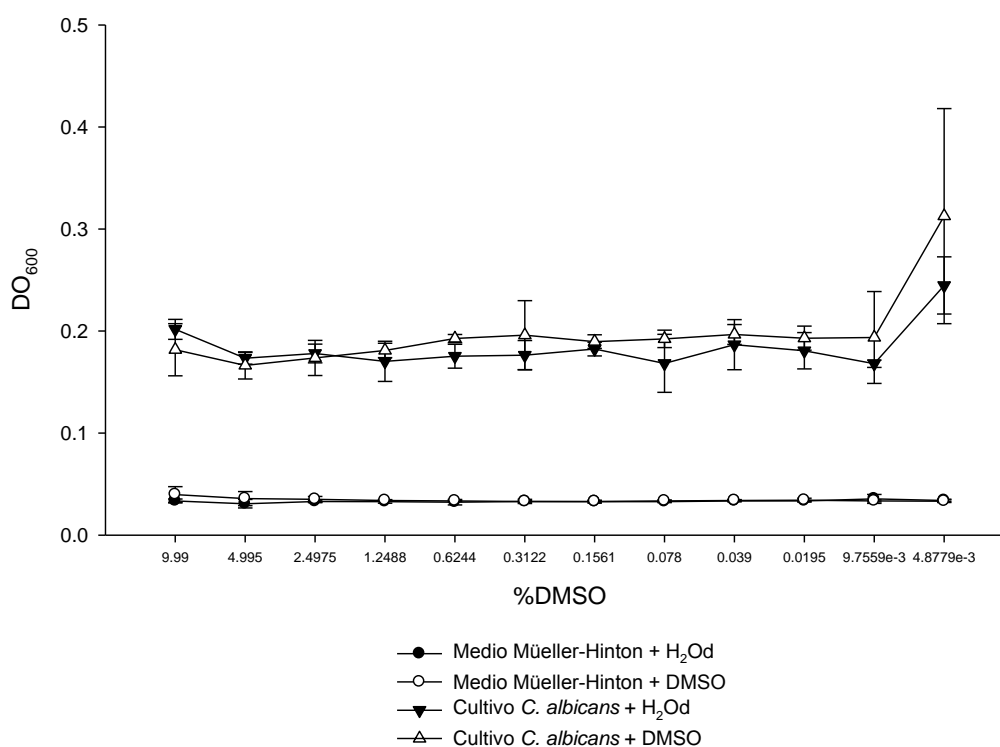


Figura 9. Efecto de la concentración del DMSO sobre el cultivo de *C. albicans*. Las barras indican la desviación estándar.

7.3. Selección de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del antibiótico control

En todos los experimentos llevados a cabo con los diferentes microorganismos así como con las diferentes concentraciones de imipenem, se colocó un control de medio MH con y sin agua desionizada estéril. Dichos controles no presentaron diferencias significativas ($P>0.05$) al comparar las lecturas a una absorbancia de 600 nm. Lo anterior sirvió de línea base para comparar la acción del antibiótico; ya que éste, al tener un efecto bactericida, hizo que los pozos donde existió inhibición del crecimiento tuvieran valores de absorbancia similares a los del medio MH sin microorganismos.

La Figura 10, muestra el efecto que tuvo la variación de la concentración del imipenem sobre el cultivo de *E. coli*. Al comparar los valores promedio de DO_{600} del cultivo de *E. coli* con agua desionizada estéril con respecto al cultivo suplementado con el antibiótico, se pudieron observar diferencias muy altamente significativas ($P<0.001$) en el intervalo de concentraciones de 100 a $0.19 \mu\text{g ml}^{-1}$, lo que indica una inhibición del crecimiento de esta bacteria a lo largo de estos puntos en la curva de dosis:respuesta. A partir de concentraciones menores de $0.10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de imipenem se da un punto de inflexión en el cual los promedios de DO_{600} entre tratamientos no mostraron diferencias significativas ($P>0.05$), por lo que a estas concentraciones el efecto del fármaco es nulo.

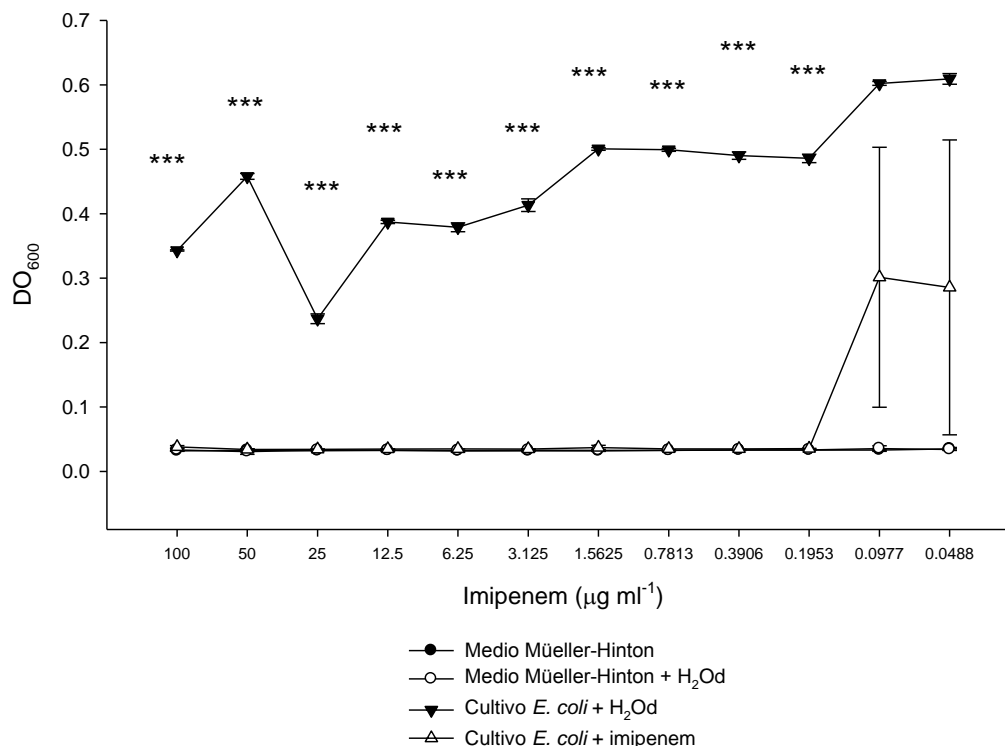


Figura 10. Efecto de la concentración del imipenem sobre el crecimiento de *E. coli*. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.001$:*.**

La curva de dosis:respuesta del imipenem con respecto al cultivo de *B. subtilis* se muestra en la Figura 11. Al comparar los valores promedio de DO_{600} del cultivo de esta bacteria con agua desionizada estéril con el cultivo más antibiótico, se pudo observar que a concentraciones de 100 a $0.39 \mu\text{g ml}^{-1}$, las diferencias entre tratamientos son muy altamente significativas ($P < 0.001$), lo cual indica la inhibición del crecimiento de *B. subtilis* a lo largo de este intervalo de concentraciones. A partir de $0.19 \mu\text{g ml}^{-1}$ de imipenem, se da un punto de inflexión en el cual los promedios de DO_{600} entre tratamientos no muestran diferencias significativas ($P > 0.05$), por lo que al disminuir la concentración del antibiótico no existe inhibición del cultivo.

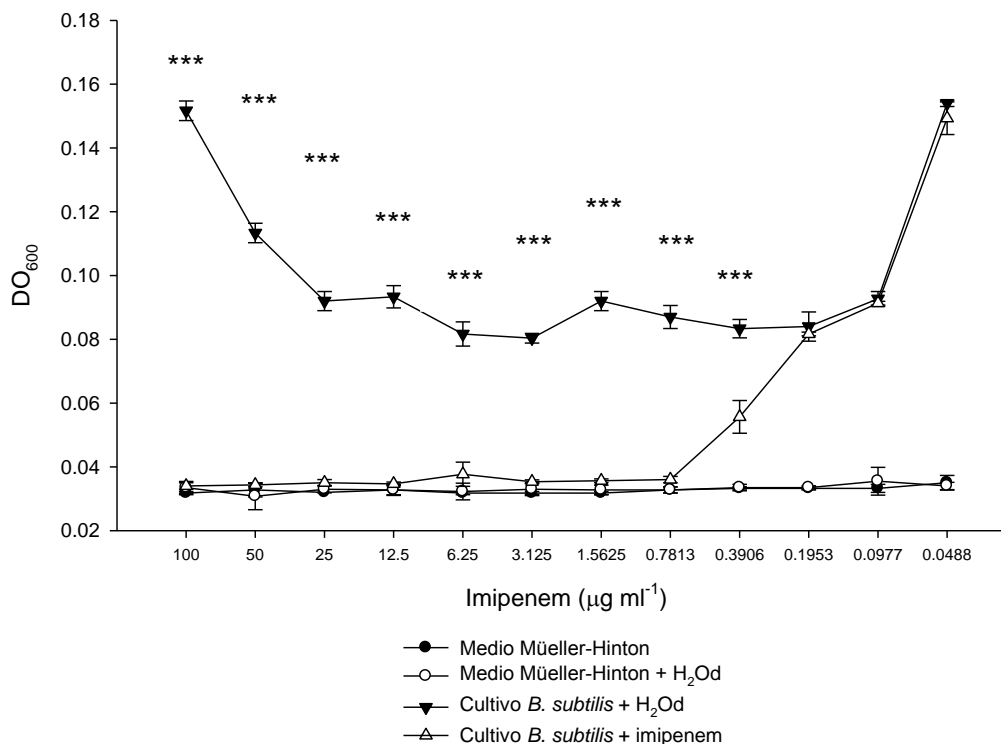


Figura 11. Efecto de la concentración del imipenem sobre el crecimiento de *B. subtilis*. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.001$:*.**

El efecto de la concentración del imipenem sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* se muestra en la Figura 12. Al comparar los valores promedio de DO_{600} del cultivo de esta bacteria Gram-negativa con agua desionizada estéril con el cultivo en presencia del antibiótico, se pudo observar que la única concentración que no presentó diferencias significativas ($P > 0.05$) fue $0.05 \mu\text{g ml}^{-1}$, teniendo los demás tratamientos diferencias muy altamente significativas ($P < 0.001$), siendo sumamente sensible este microorganismo a la acción bactericida de este medicamento.

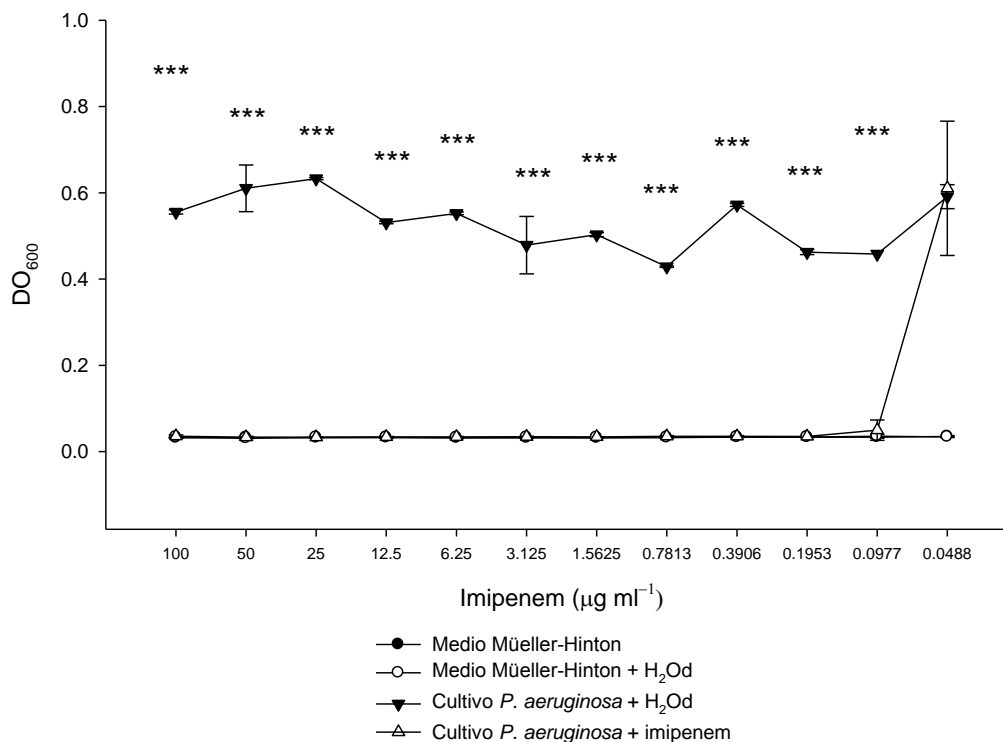


Figura 12. Efecto de la concentración del imipenem sobre el crecimiento de *P. aeruginosa*. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.001$:*.**

El efecto de la concentración del imipenem sobre el crecimiento de *C. albicans* se muestra en la Figura 13. Al comparar los valores promedio de DO₆₀₀ del cultivo de este microorganismo patógeno con agua desionizada estéril con respecto al mismo cultivo en presencia del antibiótico, se pudo observar que a concentraciones mayores a $0.10 \mu\text{g ml}^{-1}$ se presentaron diferencias muy altamente significativas ($P < 0.001$), inhibiéndose el crecimiento de la levadura; y a concentraciones menores a ésta no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$), permitiendo el crecimiento de *C. albicans*.

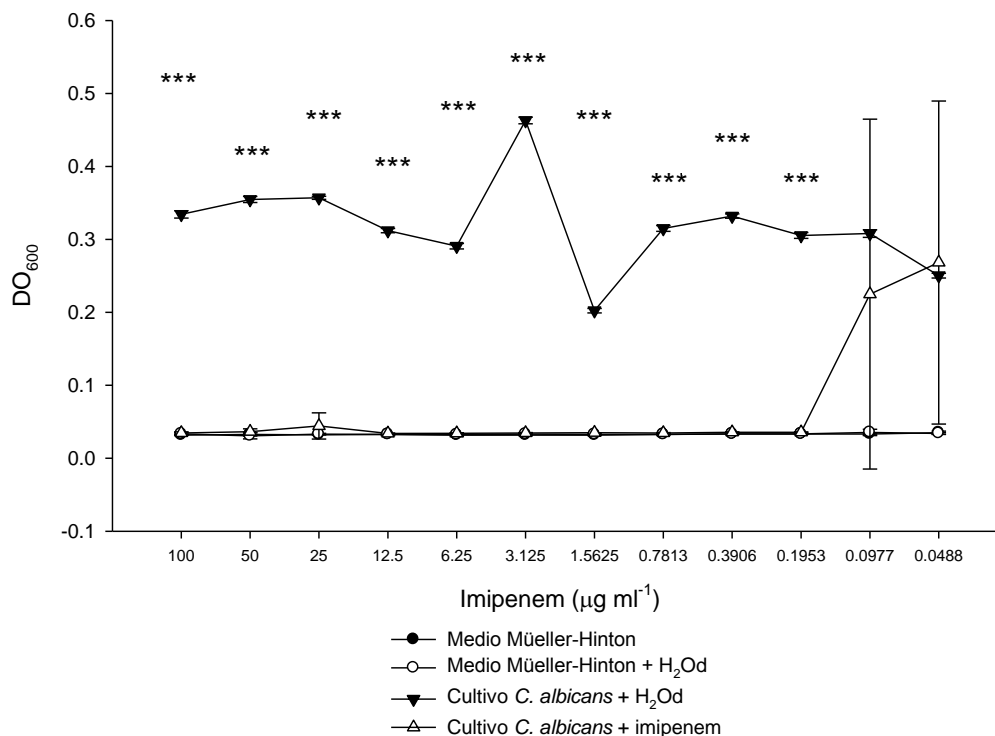


Figura 13. Efecto de la concentración del imipenem sobre el crecimiento de *C. albicans*. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.001$:*.**

Con los resultados obtenidos a partir de las Figuras de 10 a la 13, se determinó la MIC del imipenem para cada microorganismo (Tabla 3). Observándose que el microorganismo más resistente a la acción de este antibiótico fue *B. subtilis* (bacteria Gram-positiva) y que el más sensible fue *P. aeruginosa*. Cabe destacar que *C. albicans* a pesar de ser una levadura fue sensible a la acción del imipenem y que la MIC fue similar a la encontrada para la bacteria Gram-negativa *E. coli*.

Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del imipenem para el panel de microorganismos prueba

Microorganismo	MIC imipenem ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
<i>Escherichia coli</i>	0.195
<i>Bacillus subtilis</i>	0.391
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.098
<i>Candida albicans</i>	0.195

7.4. Obtención de extractos

En todos los casos, la cantidad de muestra evaluada como peso seco proveniente de las muestras colectadas de los sobrenadantes fue mayor, no obstante el volumen recuperado en cada día de cosecha fue 6 veces menor al recuperado con la biomasa, lo cual se debe al origen de las muestras de los sobrenadantes, ya que el medio de cultivo “f” se elaboró con agua de mar, cuyas sales generaron el incremento en peso.

Las muestras de biomasa tuvieron un valor de peso promedio de 0.15 ± 0.09 g y los pesos de las muestras de los sobrenadantes del medio de cultivo tuvieron en promedio 3.98 ± 0.92 g. Esto sugiere que la masa del total de las muestras de biomasa fue aproximadamente el 4% del conjunto de muestras de los sobrenadantes.

La masa de cada extracto (peso seco) obtenido de las muestras de biomasa así como de las muestras de sobrenadantes se muestran en las Tablas 4 y 5 respectivamente. Cada uno de los pesos registrados en dichas tablas procedió de una sola muestra y de una sola evaluación de peso.

Al comparar la cantidad de los extractos obtenidos con los tres diferentes solventes, la mayor cantidad de estos se obtuvo empleando agua desionizada estéril; siendo 38 veces mayor en promedio la cantidad de extracto obtenido a partir de muestras de sobrenadantes con respecto a lo recuperado a partir de biomasa, lo cual probablemente se debe a la cantidad de sales presentes en el medio de cultivo "f".

En general la masa recuperada de los extractos provenientes de los paquetes celulares y de los sobrenadantes utilizando cloroformo y diclorometano muestran pequeñas diferencias en peso. Sin embargo, ya que sólo se tuvo una muestra por tratamiento y su peso se cuantificó en una ocasión, esto no permite saber si la diferencia es o no significativa.

Los rendimientos de la extracción acuosa de las muestras de biomasa (Tabla 4) fueron del 7 al 87% del total de la masa recuperada, en relación a los extractos provenientes de la fase clorofórmica los rendimientos fueron del 1 al 17% y con diclorometano se obtuvieron rendimientos del 1 al 23%, teniendo a lo largo del proceso de extracción una pérdida del 7 al 89% del total de la muestra inicial.

Con respecto a los rendimientos de la extracción acuosa de las muestras de sobrenadantes (Tabla 5), el total de la masa recuperada fue del 46 al 93%, en relación a los extractos obtenidos con cloroformo los rendimientos fueron del 0.03 al 1.50% y con diclorometano fueron del 0.03 al 6.34%, obteniéndose pérdidas del 7 al 52% del total de la muestra inicial.

Tabla 4. Masa en peso seco (g) de las extracciones con agua (A), cloroformo (C) y diclorometano (D), así como su rendimiento y pérdida a partir de muestras liofilizadas de biomasa de cultivos de cianobacterias y microalgas

Especie	Inicial	Extracto			Pérdida	Rendimiento de la extracción			Rendimiento total	Pérdida
		Fase				Fase				
		A	C	D		A	C	D		
<i>Amphiprora paludosa</i> var. <i>hyalina</i>	0.110	0.050	0.009	0.026	0.025	45.091	8.536	23.518	77.145	22.855
<i>Chaetoceros muelleri</i>	0.108	0.054	0.008	0.005	0.041	49.972	7.256	4.800	62.028	37.972
<i>Chaetoceros</i> sp.	0.122	0.074	0.014	0.006	0.028	61.066	11.361	4.992	77.418	22.582
<i>Dunaliella bardawil</i>	0.216	0.128	0.037	0.035	0.017	59.191	17.101	16.070	92.362	7.638
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	0.172	0.102	0.006	0.004	0.060	59.411	3.335	2.117	64.863	35.137
<i>Isochrysis</i> sp.	0.067	0.041	0.005	0.005	0.016	60.807	7.175	7.877	75.859	24.141
<i>Nannochloropsis oculata</i>	0.119	0.070	0.004	0.007	0.038	58.570	3.364	5.955	67.889	32.111
<i>Nannochloropsis</i> sp.	0.107	0.066	0.008	0.006	0.027	61.386	7.865	5.403	74.654	25.346
<i>Navicula incerta</i>	0.125	0.069	0.003	0.013	0.040	55.606	2.032	10.096	67.735	32.265
<i>Nitzschia frustulum</i> var. <i>perminuta</i>	0.107	0.083	0.008	0.002	0.014	77.446	7.596	1.957	86.999	13.001
<i>Nitzschia thermalis</i> var. <i>minor</i>	0.104	0.050	0.001	0.001	0.051	48.551	1.140	1.285	50.976	49.024
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.079	0.034	0.004	0.003	0.039	42.484	4.767	3.695	50.946	49.054
<i>Porphyridium cruentum</i>	0.255	0.064	0.006	0.004	0.180	25.000	2.526	1.748	29.273	70.727
<i>Rhodomonas salina</i>	0.100	0.055	0.006	0.005	0.034	55.121	10.691	9.636	75.449	33.674
<i>Skeletonema costatum</i>	0.074	0.041	0.004	0.013	0.016	55.946	5.486	17.568	79.000	21.000
<i>Spirulina maxima</i>	0.127	0.065	0.007	0.017	0.038	50.958	5.750	13.229	69.937	30.063
<i>Synechococcus elongatus</i>	0.075	0.048	0.005	0.004	0.019	63.874	6.126	4.853	74.853	25.147

Tabla continuación

<i>Tetraselmis suecica</i>	0.048	0.027	0.004	0.006	0.011	56.067	7.322	12.552	75.941	24.059
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	0.036	0.020	0.002	0.004	0.010	56.303	5.350	11.092	72.745	27.255
<i>Synechocystis</i> sp.	0.184	0.161	0.004	0.006	0.013	87.238	2.192	3.288	92.718	7.282
E2(1C)-VZ	0.213	0.170	0.019	0.007	0.018	79.794	8.796	3.162	91.752	8.248
E8(12A)-VZ	0.326	0.123	0.053	0.007	0.144	37.725	16.228	2.002	55.955	44.045
E10-VZ	0.327	0.022	0.004	0.009	0.292	6.802	1.107	2.696	10.605	89.395
<i>Oscillatoria</i> sp. cepa 1	0.364	0.203	0.008	0.006	0.147	55.705	2.280	1.570	59.555	40.445
<i>Oscillatoria</i> sp. cepa 1 (globosa)	0.196	0.145	0.013	0.010	0.028	73.652	9.011	7.123	89.786	14.465
<i>Oscillatoria</i> sp. cepa 4	0.169	0.092	0.011	0.004	0.062	54.559	6.359	2.575	63.493	36.507
E6-GN	0.252	0.141	0.010	0.006	0.095	55.940	3.984	2.361	62.286	37.714
A6	0.089	0.037	0.006	0.003	0.043	41.305	6.547	3.701	51.552	48.448
Promedio	0.153	0.080	0.010	0.008	0.055	54.842	6.474	6.676	67.992	32.486

Comparando los rendimientos de los extractos obtenidos con cloroformo, se observó que la cantidad de masa recuperada a partir de las muestras de biomasa es 28 veces mayor en promedio que la obtenida con las muestras provenientes del sobrenadante, lo mismo ocurre con los extractos de biomasa al utilizar diclorometano, cuyos valores son superiores en 10 veces en promedio con respecto a los extractos de los sobrenadantes. Esto puede indicar que tanto cianobacterias como microalgas estén sintetizando en menor cantidad metabolitos no polares a nivel extracelular.

Con respecto al porcentaje de masa perdida en los procesos de extracción, las muestras de biomasa mostraron aproximadamente el doble de pérdida en comparación a los valores de las muestras de los sobrenadantes. Lo cual puede deberse a la poca cantidad de muestra inicial de los paquetes celulares (en promedio 0.152 ± 0.088 g) en comparación con la de los medios de cultivo (sobrenadantes, en promedio 4.034 ± 0.859 g). La cantidad de biomasa es un parámetro dependiente del tamaño celular, de la tasa de crecimiento de cada organismo y de las condiciones de cultivo.

Tabla 5. Masa en peso seco (g) de las extracciones con agua (A), cloroformo (C) y diclorometano (D), así como su rendimiento y pérdida a partir de muestras liofilizadas de sobrenadantes de cultivos de cianobacterias y microalgas

Especie	Inicial	Extracto			Pérdida	Rendimiento de la extracción			Rendimiento total	Pérdida
		Fase				Fase				
		A	C	D		A	C	D		
<i>Amphiprora paludosa</i> var. <i>hyalina</i>	3.998	3.123	0.011	0.002	0.861	78.114	0.283	0.061	78.458	21.542
<i>Chaetoceros muelleri</i>	6.091	3.103	0.051	0.039	2.898	50.937	0.839	0.648	52.424	47.576
<i>Chaetoceros</i> sp.	4.052	1.848	0.017	0.090	2.096	45.614	0.424	2.233	48.270	51.730
<i>Dunaliella bardawil</i>	5.596	3.013	0.010	0.018	2.555	53.839	0.176	0.324	54.339	45.661
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	3.623	2.801	0.001	0.002	0.818	77.312	0.028	0.055	77.394	22.580
<i>Isochrysis</i> sp.	3.214	2.742	0.002	0.039	0.431	85.312	0.066	1.218	86.595	13.405
<i>Nannochloropsis oculata</i>	3.508	2.006	0.003	0.016	1.484	57.185	0.137	0.775	58.097	42.293
<i>Nannochloropsis</i> sp.	2.745	2.143	0.003	0.003	0.597	78.072	0.092	0.100	78.264	21.736
<i>Navicula incerta</i>	4.213	3.024	0.004	0.059	1.127	71.773	0.088	1.400	73.260	26.740
<i>Nitzschia frustulum</i> var. <i>perminuta</i>	4.019	3.221	0.016	0.078	0.703	80.157	0.390	1.953	82.499	17.501
<i>Nitzschia thermalis</i> var. <i>minor</i>	4.277	3.306	0.002	0.003	0.966	77.297	0.047	0.070	77.414	22.586
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	4.237	3.181	0.002	0.004	1.051	75.073	0.036	0.089	75.197	24.803
<i>Porphyridium cruentum</i>	3.835	2.822	0.003	0.021	0.989	73.585	0.090	0.543	74.218	25.782
<i>Rhodomonas salina</i>	3.301	2.888	0.002	0.004	0.407	87.491	0.058	0.121	87.671	12.329
<i>Skeletonema costatum</i>	4.119	3.010	0.010	0.001	1.097	73.094	0.245	0.034	73.373	26.627
<i>Spirulina maxima</i>	4.214	3.117	0.011	0.004	1.083	73.965	0.252	0.084	74.301	25.699
<i>Synechococcus elongatus</i>	4.425	3.871	0.002	0.002	0.550	87.475	0.050	0.040	87.566	12.434

Tabla continuación

<i>Tetraselmis suecica</i>	3.237	2.826	0.047	0.002	0.361	87.320	1.464	0.062	88.846	11.154
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	1.201	0.964	0.002	0.076	0.158	80.306	0.203	6.340	86.849	13.151
<i>Synechocystis</i> sp.	4.393	3.745	0.010	0.003	0.635	85.264	0.218	0.066	85.547	14.453
E2(1C)-VZ	4.355	3.494	0.018	0.001	0.842	80.217	0.417	0.032	80.666	19.334
E8(12A)-VZ	4.325	3.527	0.002	0.003	0.793	81.558	0.054	0.061	81.672	18.328
E10-VZ	4.382	3.837	0.006	0.005	0.533	87.574	0.143	0.125	87.841	12.159
<i>Oscillatoria</i> sp. cepa 1	4.244	3.242	0.006	0.013	0.983	76.383	0.142	0.312	76.837	23.163
<i>Oscillatoria</i> sp. cepa 1 (globosa)	4.545	3.799	0.003	0.029	0.713	83.593	0.065	0.645	84.303	15.697
<i>Oscillatoria</i> sp. cepa 4	4.235	3.752	0.005	0.005	0.474	88.587	0.114	0.116	88.818	11.182
E6-GN	4.375	4.051	0.004	0.002	0.318	92.591	0.102	0.043	92.736	7.264
A6	4.207	3.482	0.003	0.014	0.708	82.755	0.081	0.340	83.176	16.824
Promedio	4.035	3.069	0.009	0.019	0.937	76.873	0.225	0.639	77.737	22.276

Los diferentes compuestos separados a lo largo del proceso de extracción, fueron resuspendidos en agua desionizada estéril (extractos provenientes de la fase acuosa) o en una solución de DMSO al 1.3%.

A partir de los extractos de las muestras de biomasa y de sobrenadante de microalgas y cianobacterias se formularon soluciones a una concentración final de 10 mg ml^{-1} . En el caso de los extractos acuosos provenientes de las muestras de biomasa, el peso total del extracto no se utilizó por lo que se obtuvieron volúmenes de soluciones de 0.838-3.066 ml. Los extractos a partir de la fase de cloroformo y de diclorometano se utilizaron en su totalidad, debido a la poca cantidad de masa obtenida. En este caso las “soluciones madre” tuvieron volúmenes de 0.100-5.300 ml (en promedio 0.961 ml) y de 0.1000-3.500 ml (en promedio 0.800 ml), respectivamente.

Debido a la gran cantidad de masa obtenida de los extractos a partir de la fase acuosa provenientes de las muestras de sobrenadantes, se decidió utilizar únicamente 30 mg de estos por lo que todas las “soluciones madre” tuvieron un volumen de 3 ml. Los extractos provenientes de estas mismas muestras pero de las fases de cloroformo y de diclorometano se utilizaron en su totalidad, así las “soluciones madre” tuvieron volúmenes de 0.100-5.100 ml (en promedio 0.914 ml) y de 0.100-9.000 ml (en promedio 1.921 ml) respectivamente.

7.5. Susceptibilidad de *B. subtilis* a diferentes concentraciones de DMSO empleando filtros de papel

Los resultados de este ensayo (Tabla 6) mostraron nula variabilidad de efecto sobre esta bacteria con respecto al volumen de DMSO aplicado a los filtros de papel, así como a las concentraciones de las tres soluciones probadas del solvente. El efecto inhibitorio del DMSO sobre el cultivo de *B. subtilis*, sólo se presentó al utilizar una concentración del 99.9%. A concentraciones bajas no se presentó el efecto bactericida, a diferencia del ensayo anterior en el que se utilizó el método de microdilución, esto puede deberse a que las células en los cultivos líquidos son más susceptibles al efecto del DMSO por estar en contacto directo con la solución y a que en los ensayos en placa de 96 pozos la densidad celular es menor (10^5 UFC ml^{-1}) al de las cajas petri (10^8 UFC ml^{-1}). Paralelamente, se determinó que el tiempo mínimo de secado de los filtros de papel impregnados con cualquiera de las soluciones sería de 1 hora.

Tabla 6. Susceptibilidad de *B. subtilis* a concentraciones de DMSO utilizando filtros de papel

	Halo de inhibición (mm)					
	20 μl			30 μl		
99.9% DMSO	7	7	7	7	7	7
2.5% DMSO	S/E	S/E	S/E	S/E	S/E	S/E
0.2% DMSO	S/E	S/E	S/E	S/E	S/E	S/E
Agua desionizada estéril	S/E	S/E	S/E	S/E	S/E	S/E

S/E. Sin efecto en el crecimiento

7.6. Bioensayos con microorganismos prueba (Método de Kirby-Bauer o de difusión en placa)

La prueba de difusión en placa tuvo como objetivo seleccionar de los 168 extractos, aquellos con potencial para inhibir el crecimiento de los microorganismos prueba. Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la Tabla 7.

Dos de los extractos provenientes de fases orgánicas tanto de muestras de biomasa y de sobrenadante dieron positivos para inhibir el crecimiento de *E. coli*. Por otro lado, *C. albicans* fue sensible a un extracto proveniente de la fase orgánica de una muestra de sobrenadante. *B. subtilis* fue el microorganismo más sensible al efecto de los extractos, ya que cinco de estos, procedentes de muestras de sobrenadantes de la fase acuosa inhibieron su crecimiento.

En el caso de *P. aeruginosa*, fue resistente a los compuestos presentes en los 168 extractos; observándose un crecimiento homogéneo en todas las placas de cultivo.

Estos resultados evidencian que ninguno de los extractos posee actividad antimicrobiana de amplio espectro, es decir un efecto inhibitorio contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Los extractos provenientes de microalgas fueron los que en su mayoría presentaron algún tipo de actividad antimicrobiana comparado con aquellos generados a partir de muestras de cianobacterias (*Synechocystis* sp.).

Dos extractos provenientes de *Nannochloropsis oculata*, mostraron actividad contra bacterias Gram-positivas (*B. subtilis*) y Gram-negativas (*E. coli*), estableciendo una diferencia en el tipo de muestra de la cual provienen, así como

el tipo de solvente con el que se recuperaron, lo cual afirma una naturaleza distinta de los compuestos.

Para evaluar si existían diferencias en el efecto de los 168 extractos analizados sobre el crecimiento de *E. coli*, se utilizó un ANOVA múltiple, encontrando que los dos extractos que inhibieron el crecimiento de esta bacteria son iguales (*a*) con respecto al efecto, ya que no existen diferencias significativas entre ambos ($P>0.05$) y son distintos en cuanto al efecto, al compararlos con el resto de los extractos (*b*).

De igual manera se evaluó si existían diferencias en el efecto de todos los extractos probados contra *B. subtilis*, el análisis estadístico indicó que el conjunto de datos que presentó actividad antimicrobiana es diferente ($P<0.05$) del resto de los extractos confrontados contra *Bacillus*, no existiendo diferencias significativas entre ellos ($P>0.05$). Sin embargo, ninguno de los análisis estadísticos tienen sentido biológico, ya que los extractos provienen de diferentes organismos y fuentes (muestra de biomasa o sobrenadante), además de haberse obtenido con distintos solventes.

Tabla 7. Ensayo de difusión en placa para la selección de extractos orgánicos y acuosos con actividad antimicrobiana

Microalga o cianobacteria	Tipo de Muestra	Solvente	Halo de inhibición (cm)			
			<i>Escherichia coli</i> [§]	<i>Bacillus subtilis</i> [¥]	<i>Candida albicans</i> [£]	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [§]
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Biomasa	Cloroformo	0.73±0.06 ^a			S/E
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Sobrenadante	Diclorometano	0.83±0.12 ^a			S/E
<i>Chaetoceros</i> sp.	Sobrenadante	Agua		1.87±0.12 ^{a*}		S/E
<i>Isochrysis</i> sp.	Sobrenadante	Agua		1.80±0.00 ^{a*}		S/E
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Sobrenadante	Agua		1.83±0.06 ^{a*}		S/E
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Sobrenadante	Agua		1.17±0.06 ^{a*}		S/E
<i>Synechocystis</i> sp.	Sobrenadante	Agua		1.03±0.12 ^{a*}		S/E
<i>Nitzschia thermalis</i> var. <i>minor</i>	Sobrenadante	Cloroformo			0.70±0.00	S/E
Imipenem			3.60±0.00	3.40±0.00	3.40±0.00	3.80±0.00
DMSO al 1.3%			S/E	S/E	S/E	S/E
Agua de mar liofilizada			S/E	S/E	S/E	S/E
Medio "F"			S/E	S/E	S/E	S/E
Agua desionizada			S/E	S/E	S/E	S/E

Halos poco definidos; S/E. Sin efecto en el crecimiento; §. Concentración de imipenem de 68 µg ml⁻¹; ¥. Concentración de imipenem de 204 µg ml⁻¹; £. Concentración de imipenem de 17 µg ml⁻¹. No existe diferencia significativa entre los tratamientos a. No existe diferencia significativa entre los tratamientos a.

7.7. Bioensayos con microorganismos prueba (Método de microdilución)

Subsecuentemente, la sensibilidad de *E. coli*, *B. subtilis* y *C. albicans* a los extractos de microalgas y cianobacterias fue evaluada utilizando el Método de microdilución.

En todos los ensayos, se utilizó al imipenem (concentración inicial $68 \mu\text{g ml}^{-1}$) como tratamiento control positivo de la inhibición del crecimiento y como tratamiento control negativo se utilizó medio MH más DMSO (concentración inicial de 1.3%) o medio MH más Agua desionizada estéril, dependiendo del tipo de extracto analizado (orgánico o acuoso).

El primer extracto en probarse fue el proveniente de la biomasa de *Nannochloropsis oculata* con cloroformo sobre el cultivo de *E. coli* (Figura 14). Los valores promedio obtenidos de DO_{600} del cultivo de *E. coli* más el extracto presentaron diferencias, a lo largo de todas las diluciones con respecto a los valores promedio de DO_{600} del cultivo de *E. coli* más DMSO. Estas diferencias van de las muy altamente significativas ($P < 0.001$), a altamente significativas ($P < 0.01$) y significativas ($P < 0.05$). Sin embargo, al compararse las lecturas de DO_{600} obtenidas con el extracto y utilizando imipenem (MIC $1.06 \mu\text{g ml}^{-1}$), se observó que aunque los valores de absorbancia disminuyeron de manera significativa al adicionar el extracto al cultivo de *E. coli*, no llegaron a obtenerse valores de absorbancia comparables a los obtenidos cuando se adicionó el imipenem al cultivo de *E. coli*.

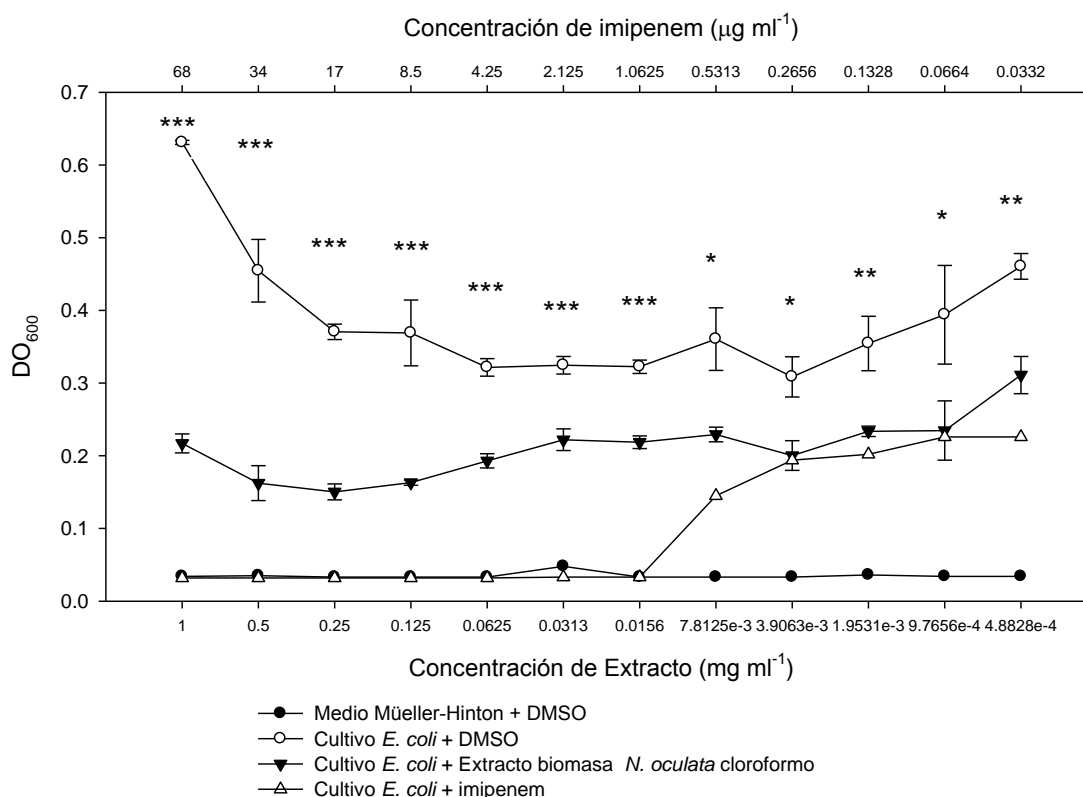


Figura 14. Efecto del extracto de biomasa de *N. oculata* con cloroformo sobre el cultivo de *E. coli*. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.001$:***; $P < 0.01$:** y $P < 0.05$:*.

Posterior a un mes de almacenar a -20°C el extracto proveniente de la biomasa de *N. oculata* obtenido con cloroformo, se evaluaron posibles cambios en su actividad antimicrobiana sobre el cultivo de *E. coli* (Figura 15). Los valores promedio obtenidos de DO_{600} del cultivo de *E. coli* más el extracto, no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) a lo largo de las doce diluciones, con respecto a los valores promedio de DO_{600} del cultivo de *E. coli* más DMSO. Por lo que los compuestos extraídos con cloroformo a partir de la biomasa de *N. oculata* presentaron poca estabilidad bajo las condiciones de almacenamiento y manipulación (descongelamiento del extracto a temperatura ambiente). La MIC de imipenem para este ensayo fue de $4.25 \mu\text{g ml}^{-1}$.

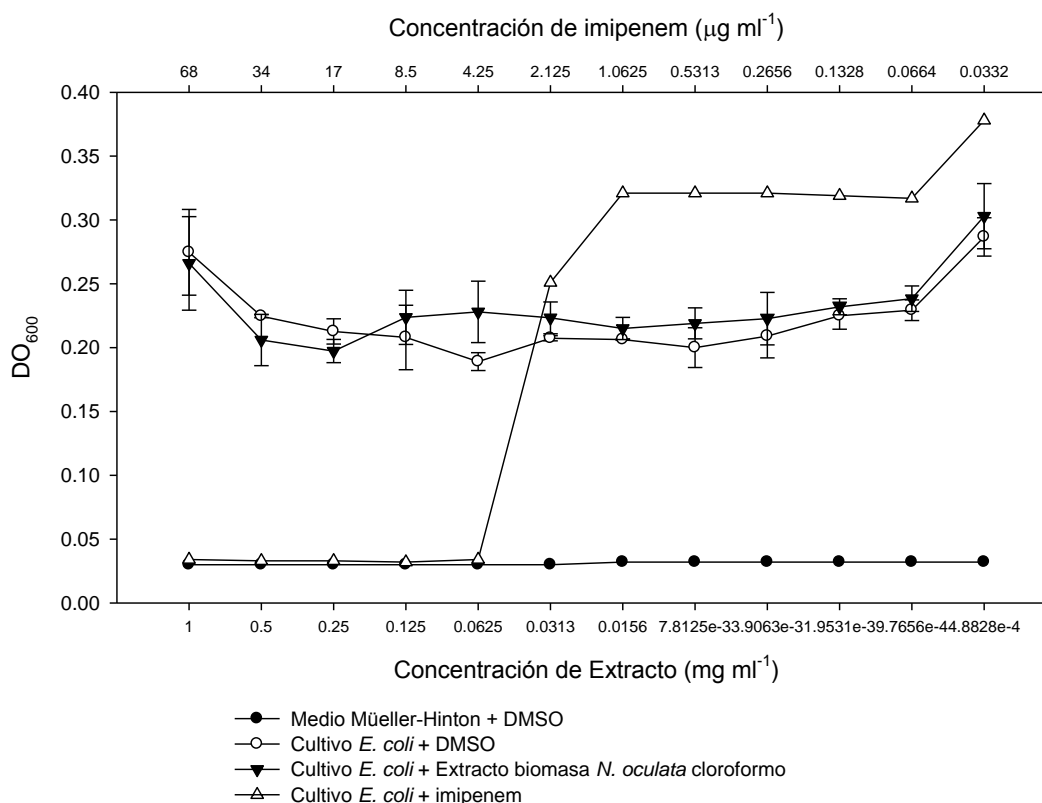


Figura 15. Cambios en la actividad antimicrobiana del extracto de biomasa de *N. oculata* con cloroformo sobre el cultivo de *E. coli* por efecto del tiempo de almacenamiento y manipulación. Las barras indican la desviación estándar.

El siguiente extracto a analizar fue el obtenido a partir del sobrenadante de *Dunaliella tertiolecta* con diclorometano sobre el cultivo de *E. coli* (Figura 16). Los valores promedio obtenidos de DO₆₀₀ del cultivo de *E. coli* más el extracto, presentaron diferencias (muy altamente significativas, $P < 0.001$; altamente significativas, $P < 0.01$ y significativas, $P < 0.05$) en diez de las doce diluciones con respecto a los valores promedio de DO₆₀₀ del cultivo de *E. coli* más DMSO. El extracto disminuyó el crecimiento del cultivo de *E. coli* de manera significativa hasta una concentración de 1.95×10^{-3} mg ml⁻¹, sin llegar a obtenerse lecturas de DO₆₀₀ iguales a las del medio MH como sucedió al utilizar imipenem. La MIC alcanzada con imipenem contra el cultivo de *E. coli* fue de $1.06 \mu\text{g ml}^{-1}$.

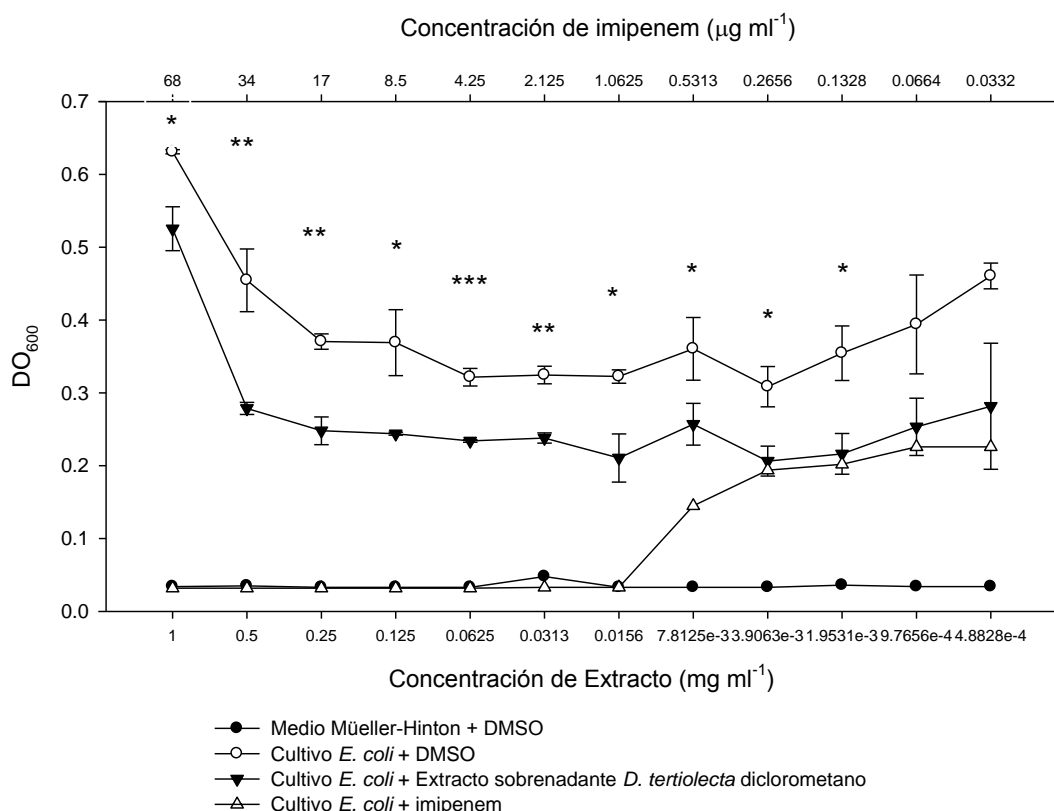


Figura 16. Efecto del extracto del sobrenadante del cultivo de *D. tertiolecta* con diclorometano sobre el cultivo de *E. coli*. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.001$:*; $P < 0.01$:** y $P < 0.05$:*.**

La Figura 17 muestra los cambios en la actividad antimicrobiana del extracto del sobrenadante del cultivo de *D. tertiolecta* obtenido con diclorometano sobre el cultivo de *E. coli*, posterior a un mes de almacenado a -20°C . Los valores promedio obtenidos de DO_{600} del cultivo de *E. coli* más el extracto, no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) a lo largo de las doce diluciones, con respecto a los valores promedio de DO_{600} del cultivo de *E. coli* más DMSO. Por lo que los compuestos extraídos con diclorometano a partir del sobrenadante del cultivo de *D. tertiolecta* pierden su actividad antimicrobiana. La MIC para el imipenem fue de $8.50 \mu\text{g ml}^{-1}$.

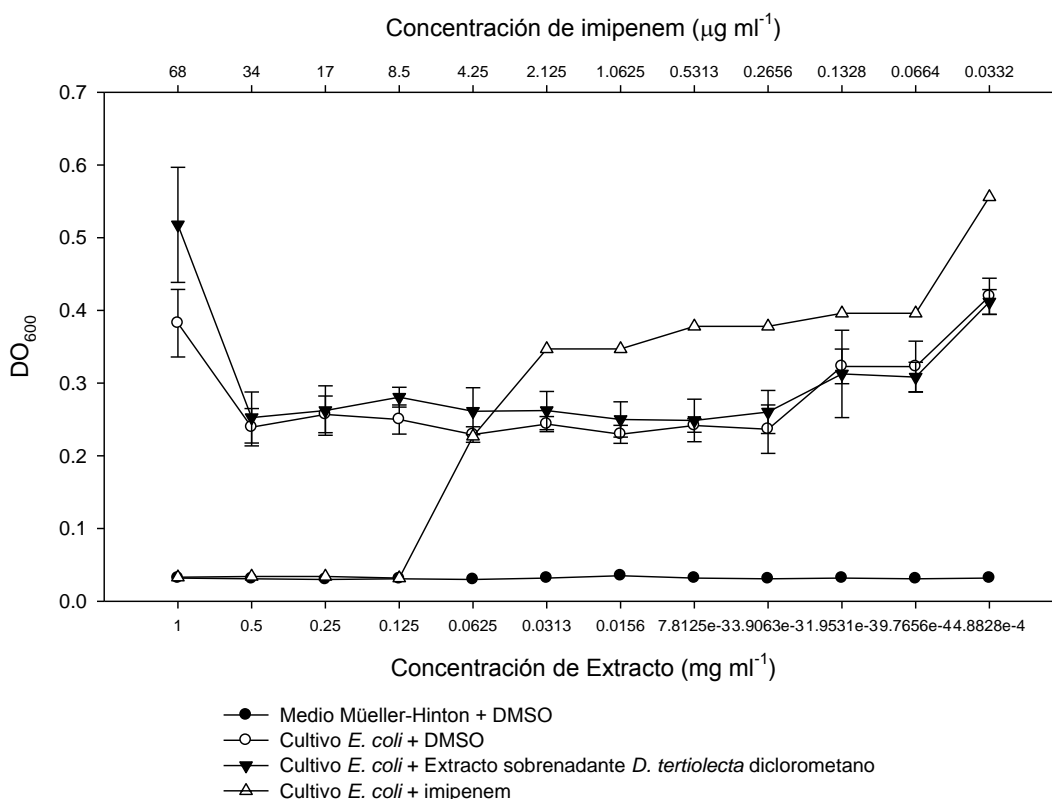


Figura 17. Cambios en la actividad antimicrobiana del extracto del sobrenadante del cultivo de *D. tertiolecta* con diclorometano sobre el cultivo de *E. coli* por efecto del tiempo de almacenamiento y manipulación. Las barras indican la desviación estándar.

El tercer extracto analizado fue el obtenido a partir del sobrenadante de *Nitzschia thermalis* var. *minor* con cloroformo sobre el cultivo de *C. albicans* (Figura 18). Al comparar los valores promedio de DO₆₀₀ del cultivo de *C. albicans* más DMSO con respecto a los valores promedio de DO₆₀₀ del cultivo más el extracto, se observó que la única concentración en mostrar diferencias significativas ($P < 0.05$) fue la de 0.87 mg ml⁻¹, no existiendo diferencias significativas ($P > 0.05$) con el resto de las diluciones de extracto. Lo cual puede deberse a la presencia insuficiente en la cantidad de extracto de los compuesto(s) con actividad antimicótica. La MIC del imipenem, utilizado como control positivo de la inhibición del crecimiento de la levadura fue de 0.07 µg ml⁻¹.

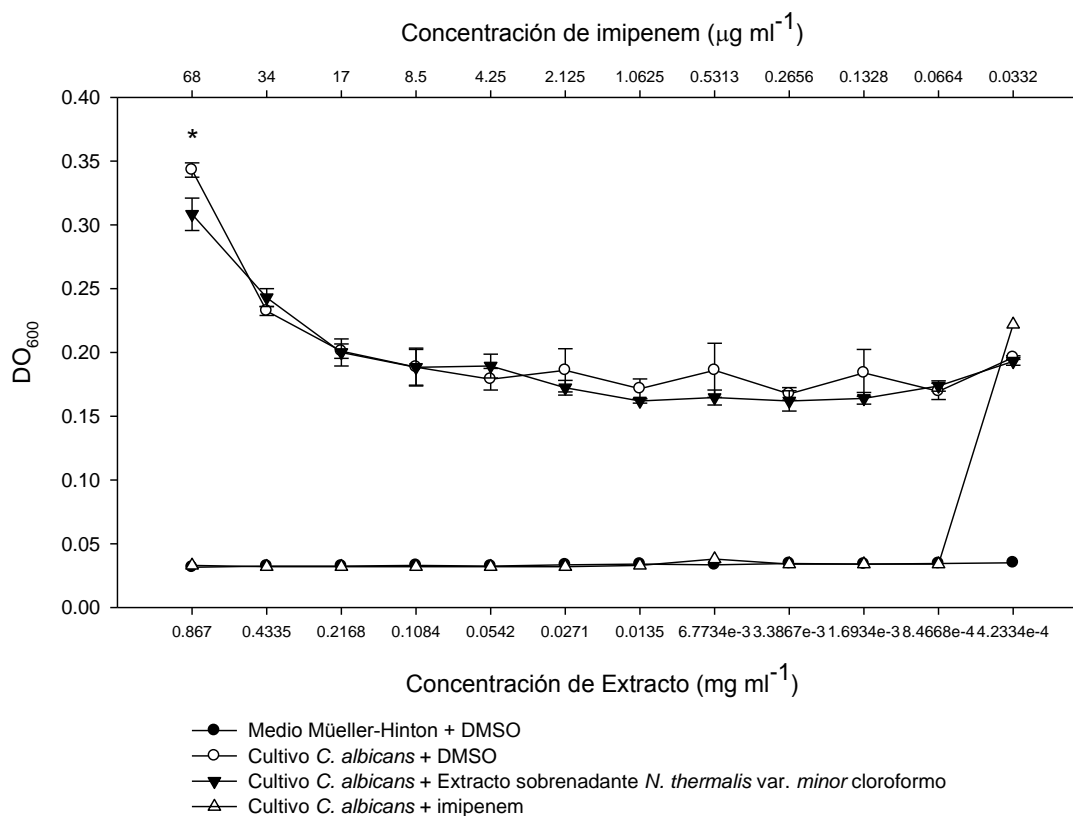


Figura 18. Efecto del extracto del sobrenadante del cultivo de *N. thermalis* var. *minor* con cloroformo sobre el cultivo de *C. albicans*. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.05$:*.

La Figura 19 muestra los cambios en la actividad antimicrobiana del extracto del sobrenadante de *N. thermalis* var. *minor* con cloroformo sobre el cultivo de *C. albicans*, posterior a un mes de almacenado a -20°C . Los valores promedio obtenidos de DO_{600} del cultivo de *C. albicans* más el extracto, no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) a lo largo de las diluciones con respecto a los valores promedio de DO_{600} del cultivo de *C. albicans* más DMSO. Por lo que el o los compuestos extraídos pierden su escasa actividad antimicótica, esto originado por el tiempo de almacenamiento y por el proceso de descongelamiento del extracto. La MIC del imipenem, utilizado como control positivo de la inhibición del crecimiento de la levadura fue de $2.12 \mu\text{g ml}^{-1}$.

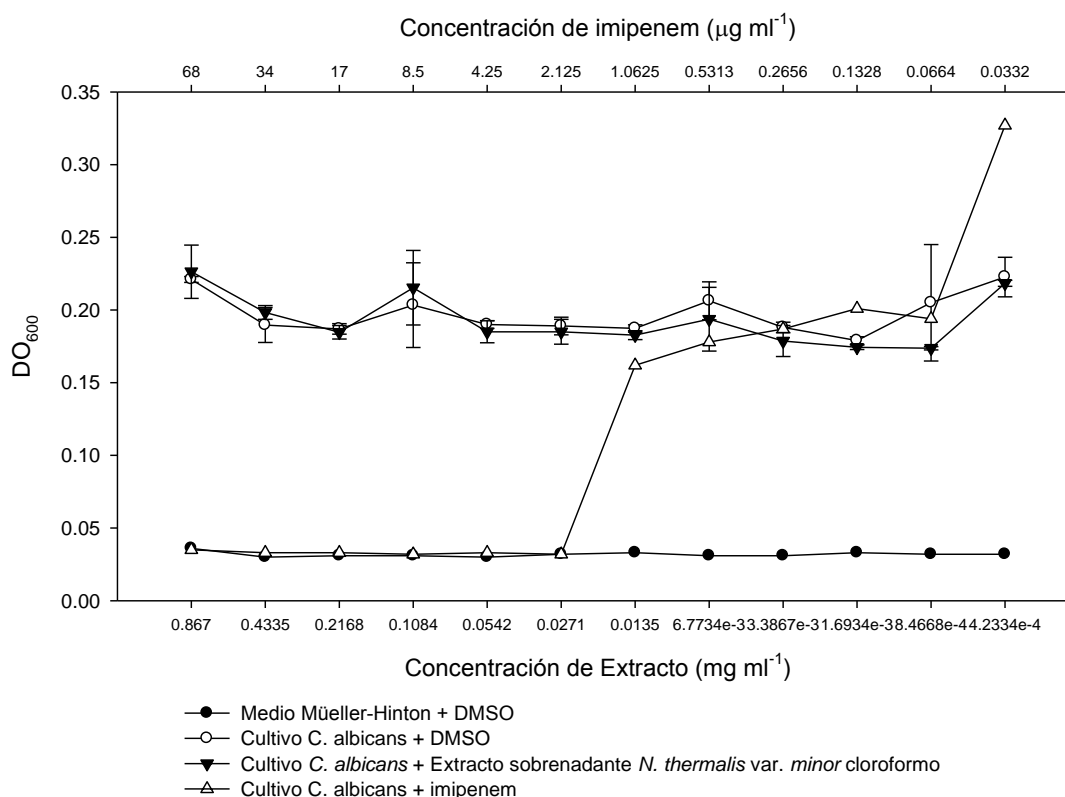


Figura 19. Cambios en la actividad antimicrobiana del extracto del sobrenadante del cultivo de *N. thermalis* var. *minor* con cloroformo sobre el cultivo de *C. albicans* por efecto del tiempo de almacenamiento y manipulación. Las barras indican la desviación estándar.

Dado que cinco de los ocho extractos que dieron positivos en actividad antimicrobiana fueron de naturaleza acuosa, se decidió probar el efecto de las sales presentes en el H₂O_m y por consiguiente en el medio “f” donde se cultivaron las microalgas y cianobacterias, sobre la absorbancia a 600 nm del medio MH. La Figura 20 muestra que ninguna de las diluciones probadas de H₂O_m y de medio “f” presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) comparadas con los valores promedio de DO₆₀₀ del medio de cultivo MH con agua desionizada estéril. Por lo que se descarta un efecto sobre la absorbancia a 600 nm del medio MH originado por las sales presentes en los extractos acuosos provenientes de los cultivos de microalgas y de cianobacterias.

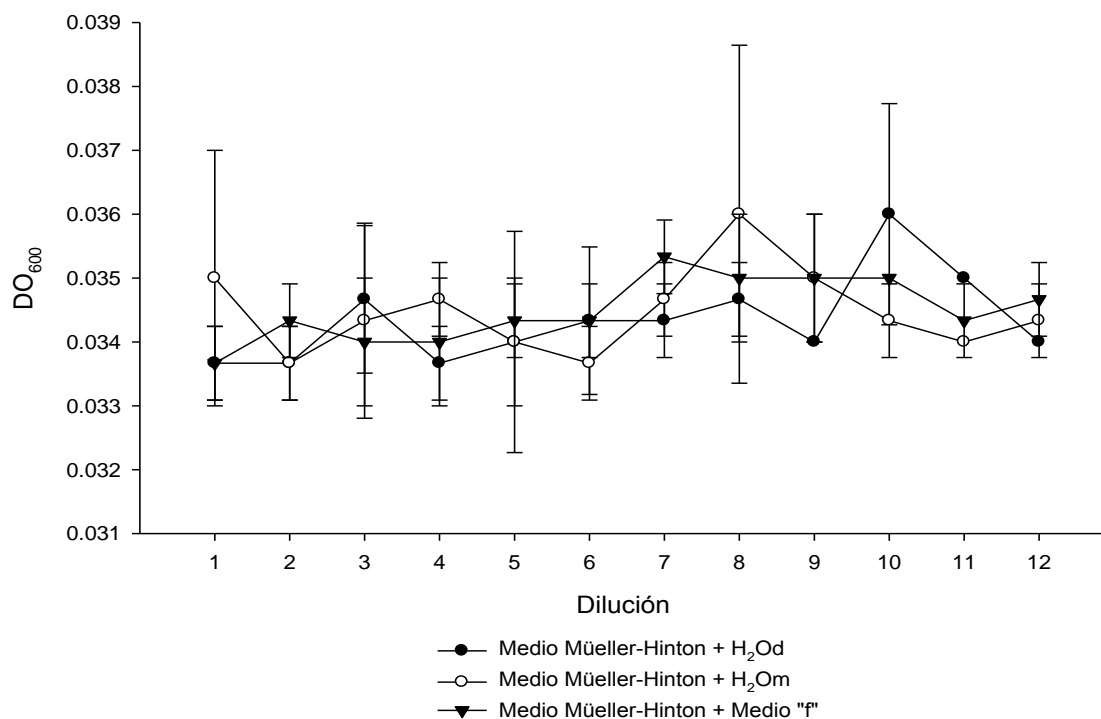


Figura 20. Efecto de las sales del H₂Om sobre la absorbancia medida a 600 nm del Medio Müller-Hinton. Las barras indican la desviación estándar.

Asimismo, se decidió probar el efecto de las sales presentes en el H₂Om y en el medio "f" sobre el cultivo de *B. subtilis*. La Figura 21 muestra que ninguna de las diluciones probadas de H₂Om y de medio "f" más el cultivo de *B. subtilis*, presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) comparadas con los valores promedio de DO₆₀₀ del tratamiento control (cultivo de *B. subtilis* más agua desionizada estéril). Estos experimentos permitieron descartar un efecto inhibitorio sobre *B. subtilis* originado por las sales presentes en los extractos acuosos provenientes de los cultivos de microalgas y cianobacterias.

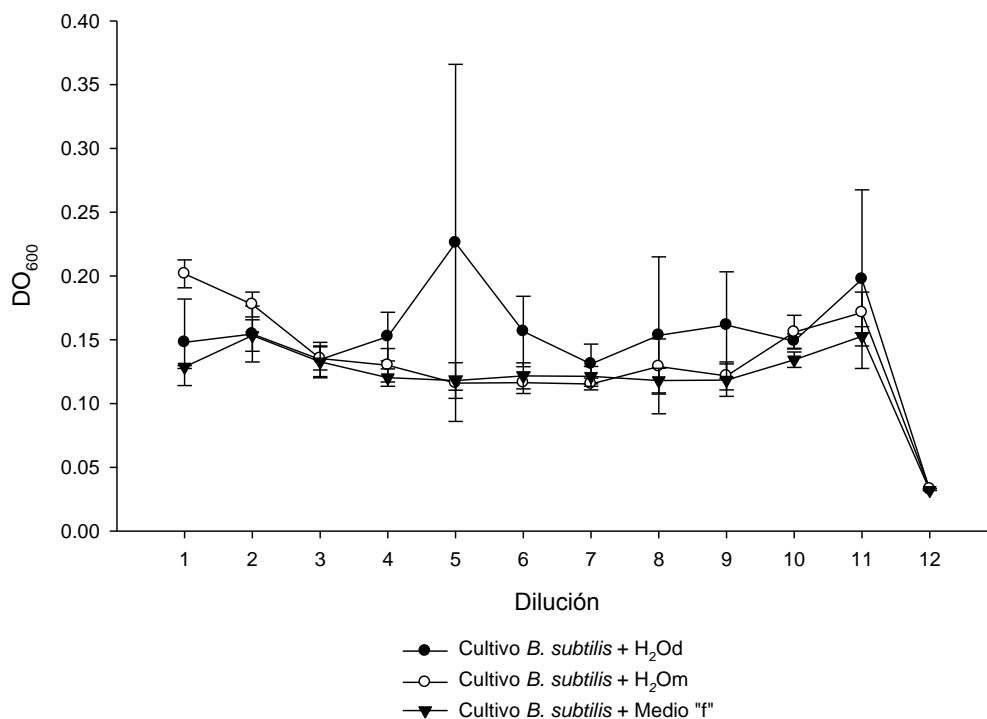


Figura 21. Efecto de las sales del H₂O_m sobre el cultivo de *B. subtilis*. Las barras indican la desviación estándar.

El primer extracto acuoso a analizar sobre el cultivo de *B. subtilis* fue el obtenido del sobrenadante de *Chaetoceros* sp. (Figura 22). Los valores promedio obtenidos de DO₆₀₀ del cultivo de *B. subtilis* más extracto, no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en las primeras ocho diluciones, con respecto a los valores promedio de DO₆₀₀ del cultivo de *B. subtilis* más DMSO. A partir de la concentración de extracto de $3.91 \times 10^{-3} \text{ mg ml}^{-1}$, se dio un punto de inflexión en donde los valores promedio de DO₆₀₀ del cultivo mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto a los valores promedio de DO₆₀₀ del tratamiento control. Esta actividad antimicrobiana tardía, probablemente se deba a que a concentraciones altas de extracto existe en mayor proporción algún compuesto que inhibe la actividad antimicrobiana (proteica o peptídica) y al disminuir la concentración de este, se elimina el efecto oculto de la actividad

antimicrobiana de lo(s) compuesto(s). Para este ensayo, la MIC de imipenem fue de $0.53 \mu\text{g ml}^{-1}$.

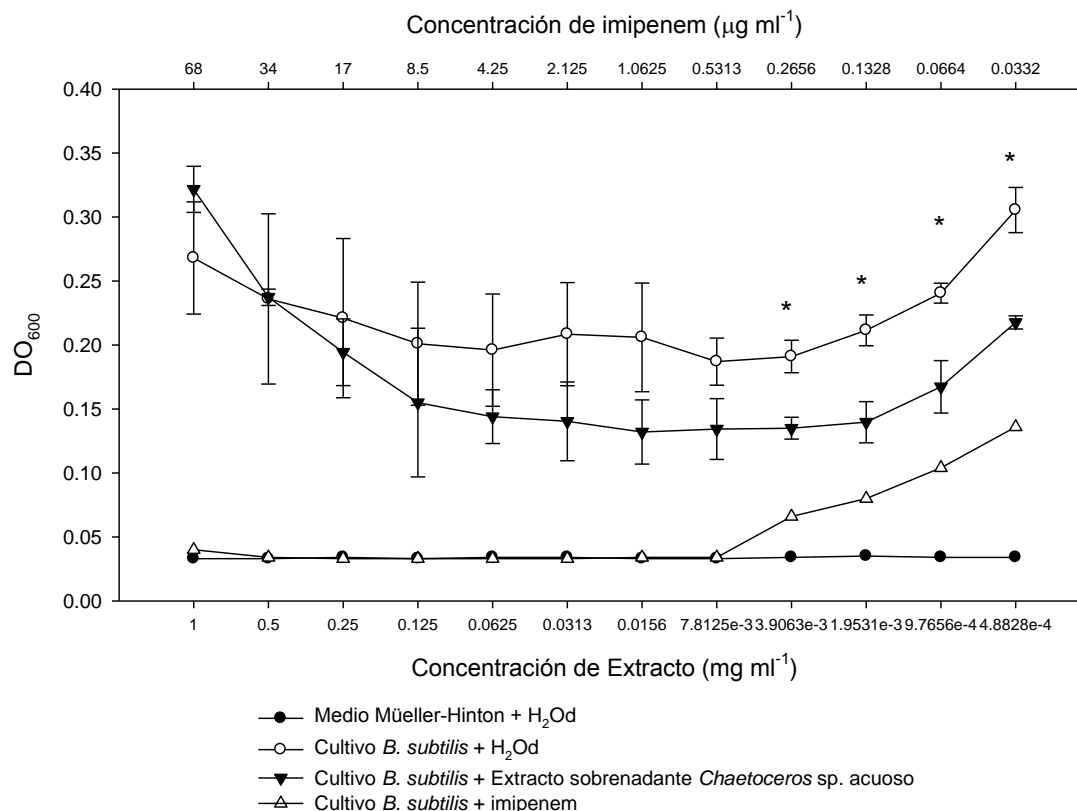


Figura 22. Efecto del extracto acuoso del sobrenadante de *Chaetoceros* sp. sobre el cultivo de *B. subtilis*. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.05$:*.

Este mismo ensayo se repitió posterior a un mes para comprobar cambios en la actividad antimicrobiana con cada uno de los extractos acuosos por efecto del tiempo de almacenamiento a -20°C y por descongelar las muestras a temperatura ambiente.

La Figura 23 muestra los cambios en la actividad antimicrobiana del extracto acuoso proveniente del sobrenadante de *Chaetoceros* sp. sobre el cultivo de *B. subtilis*. Los valores promedio obtenidos de DO_{600} del cultivo de *B. subtilis* más el extracto, presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) únicamente a

concentraciones de extracto de 1.00 y 0.50 mg ml⁻¹, con respecto a los valores promedio de DO₆₀₀ del cultivo de *B. subtilis* más H₂Od. Lo que indica que las dos primeras concentraciones de extracto promueven el crecimiento de *B. subtilis*, lo que tal vez se deba a un aumento de proteínas y péptidos libres provenientes del extracto acuoso, que por las condiciones de almacenamiento y manipulación pudieron desnaturalizarse perdiendo con ello su actividad antimicrobiana y que sirvieron como fuente de nitrógeno adicional para el crecimiento de esta bacteria. La MIC de imipenem fue de 4.25 µg ml⁻¹.

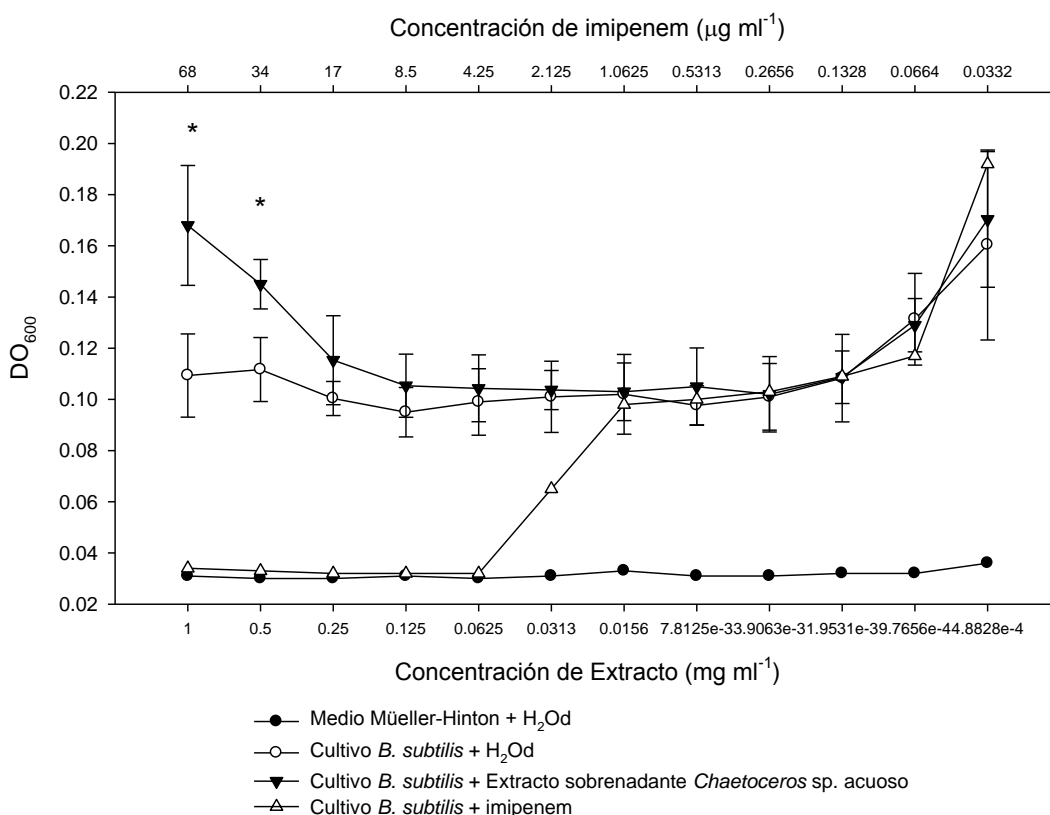


Figura 23. Cambios en la actividad antimicrobiana del extracto acuoso del sobrenadante de *Chaetoceros* sp. sobre el cultivo de *B. subtilis* por efecto del tiempo de almacenamiento y manipulación. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.05$:*.

El efecto del extracto acuoso del sobrenadante de *Isochrysis* sp. sobre el cultivo de *B. subtilis* se muestra en la Figura 24. Los valores promedio obtenidos de DO₆₀₀ del cultivo de *B. subtilis* más extracto, presentaron diferencias (significativas,

$P < 0.05$ y altamente significativas, $P < 0.01$) a partir de la concentración de 0.12 mg ml^{-1} , con respecto a los valores promedio de DO_{600} del cultivo más H_2O_d . Disminuyendo así, el crecimiento de *B. subtilis*, pero sin llegar a mostrar lecturas de DO_{600} iguales a las del medio MH. Al parecer a concentraciones altas de extracto existe algún compuesto que limita la actividad antimicrobiana. La MIC alcanzada con imipenem fue de $0.53 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$.

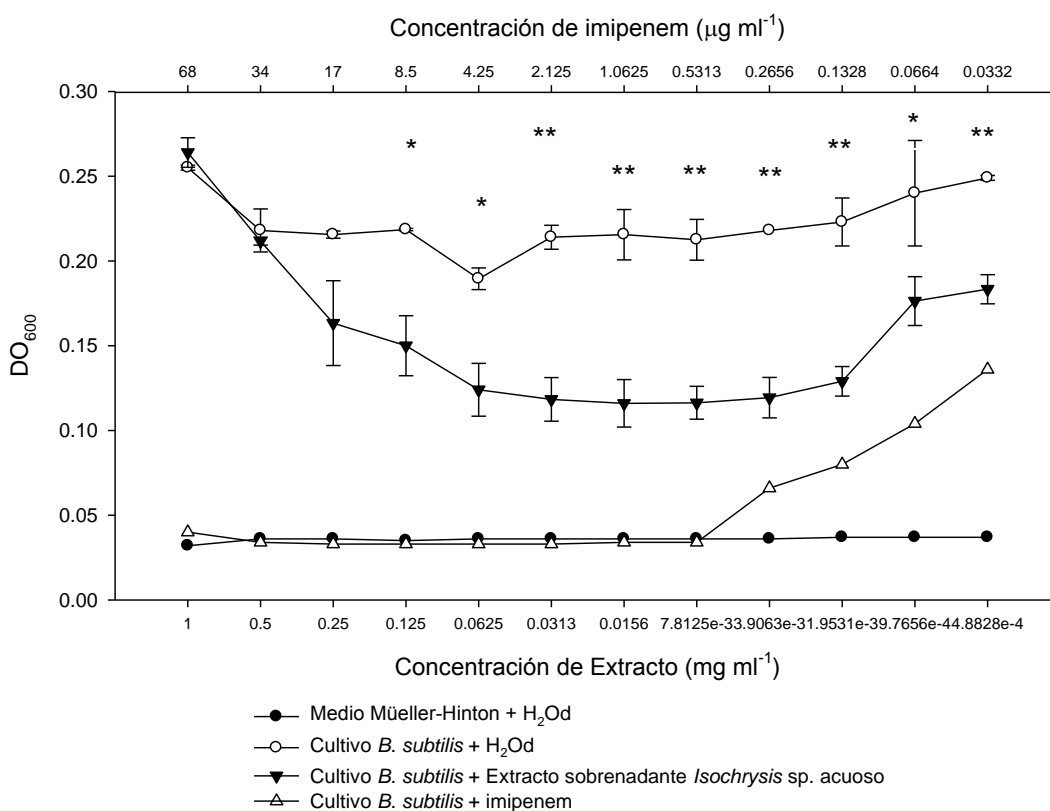


Figura 24. Efecto del extracto acuoso del sobrenadante de *Isochrysis* sp. sobre el cultivo de *B. subtilis*. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.05$:* y $P < 0.01$:.**

La Figura 25 muestra los cambios en la actividad antimicrobiana del extracto acuoso proveniente del sobrenadante de *Isochrysis* sp. sobre el cultivo de *B. subtilis*. Los valores promedio obtenidos de DO_{600} del cultivo de *B. subtilis* con extracto, presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) sólo en las dos primeras concentraciones de extracto (1.00 y 0.50 mg ml^{-1}) con respecto a los valores

promedio de DO_{600} del cultivo de *B. subtilis* con H_2O_d . Lo que indica, que el extracto acuoso perdió su actividad antimicrobiana, promoviendo el crecimiento de *B. subtilis* a estas concentraciones, debido al aumento de proteínas y péptidos libres (desnaturalizados) del extracto acuoso. La MIC obtenida con el imipenem fue de $4.25 \mu\text{g ml}^{-1}$.

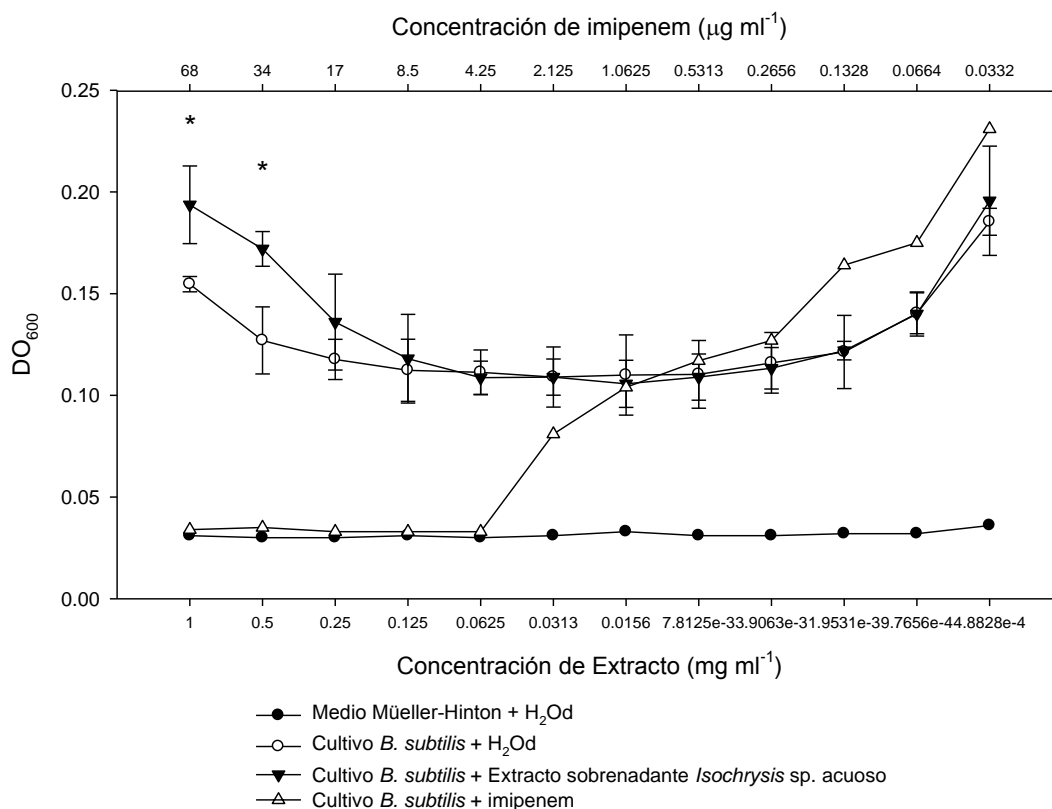


Figura 25. Cambios en la actividad antimicrobiana del extracto acuoso del sobrenadante de *Isochrysis* sp. sobre el cultivo de *B. subtilis* por efecto del tiempo de almacenamiento y manipulación. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.05$:*.

El tercer extracto acuoso a probar contra el cultivo de *B. subtilis* fue el proveniente del sobrenadante de *N. oculata* (Figura 26). Los valores promedio obtenidos de DO_{600} del cultivo de *B. subtilis* más extracto, presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$ y altamente significativas, $P < 0.01$) a partir de la concentración de 0.03 mg ml^{-1} con respecto a los valores promedio de DO_{600} del cultivo más H_2O_d , sin que se alcanzaran lecturas de DO_{600} iguales a las del medio MH. Evidenciando la

existencia de algún compuesto o compuestos limitantes para la actividad antimicrobiana. La MIC alcanzada con imipenem fue de $0.53 \mu\text{g ml}^{-1}$.

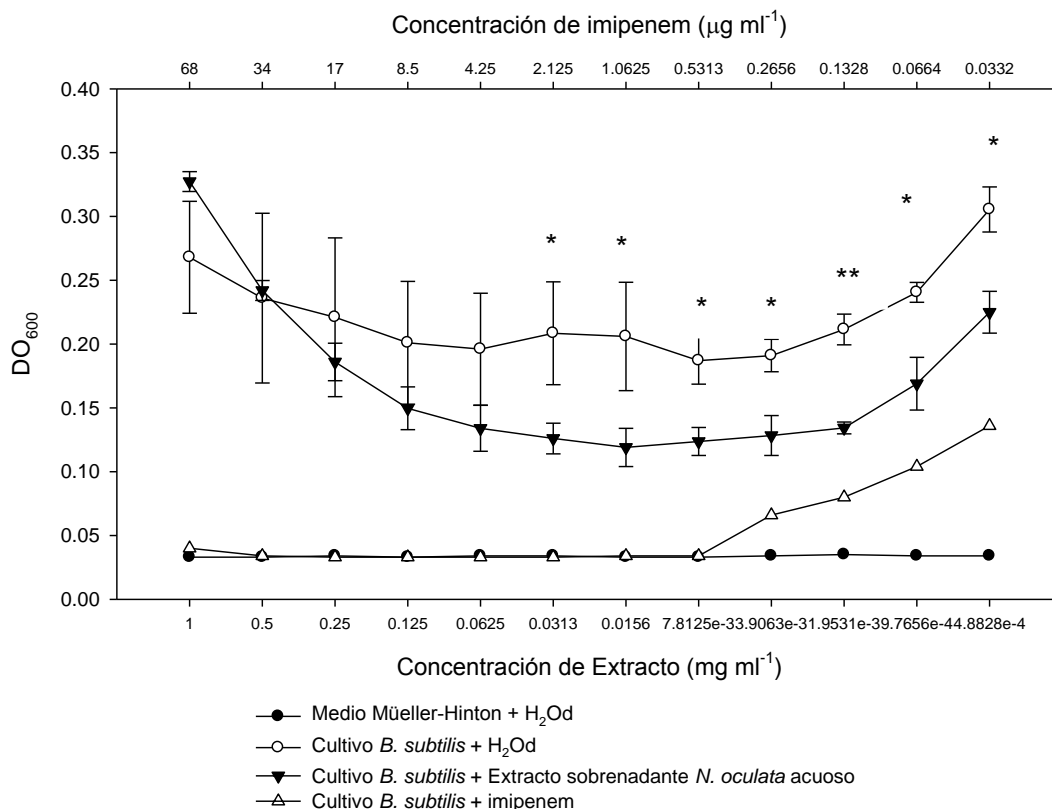


Figura 26. Efecto del extracto acuoso del sobrenadante de *N. oculata* sobre el cultivo de *B. subtilis*. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.05$:* y $P < 0.01$:**.

La Figura 27 muestra los cambios en la actividad antimicrobiana del extracto acuoso proveniente del sobrenadante de *N. oculata* sobre el cultivo de *B. subtilis*. Los valores promedio obtenidos de DO_{600} del cultivo de *B. subtilis* más el extracto, presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$, $P < 0.01$ y $P < 0.001$) en las tres primeras concentraciones, con respecto a los valores promedio de DO_{600} del cultivo de *B. subtilis* más H_2O_2 . No obteniéndose diferencias significativas ($P > 0.05$) en las concentraciones restantes. Esto indica, que el extracto acuoso perdió su actividad antimicrobiana, promoviendo ahora el crecimiento de *B. subtilis*

a concentraciones de extracto de 1.00, 0.50 y 0.25 mg ml⁻¹. La MIC alcanzada con imipenem fue de 4.25 µg ml⁻¹.

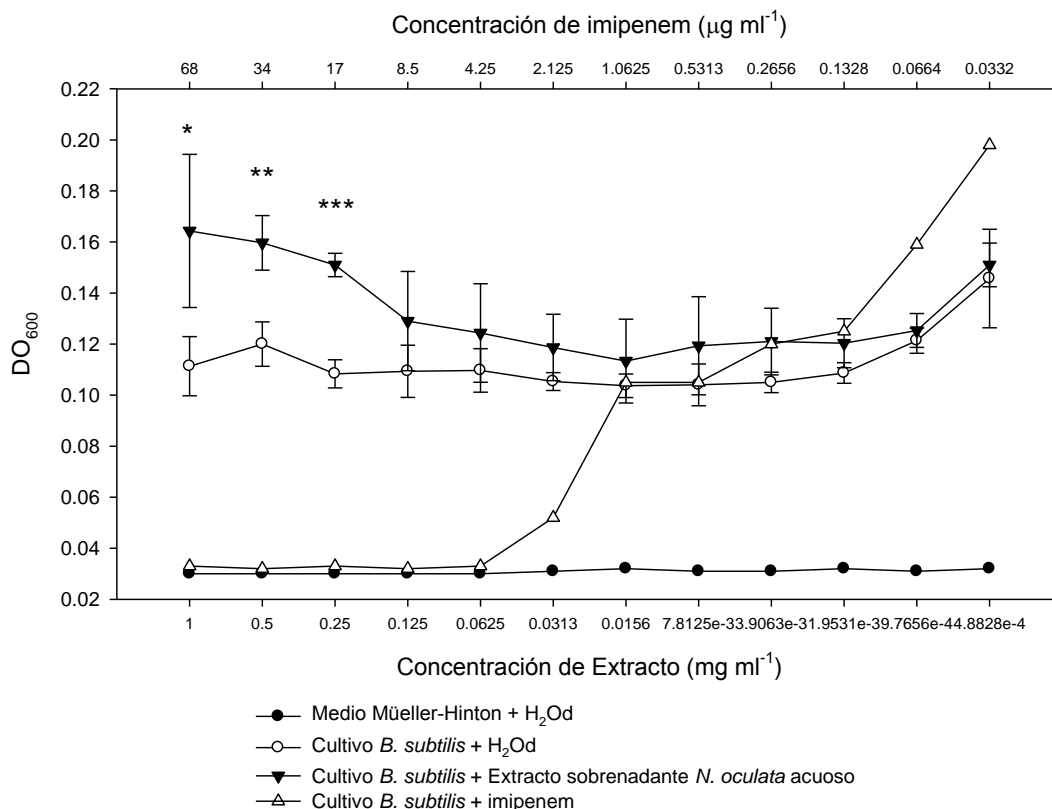


Figura 27. Cambios en la actividad antimicrobiana del extracto acuoso del sobrenadante de *N. oculata* sobre el cultivo de *B. subtilis* por efecto del tiempo de almacenamiento y manipulación. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.05$:*; $P < 0.01$:** y $P < 0.001$:***.

El siguiente extracto a probar contra el cultivo de *B. subtilis* fue el acuoso proveniente del sobrenadante de *Thalassiosira pseudonana* (Figura 28). Los valores promedio obtenidos de DO₆₀₀ del cultivo de *B. subtilis* más extracto, presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) y altamente significativas ($P < 0.01$) a partir de 0.25 mg ml⁻¹ de extracto con respecto a los valores promedio de DO₆₀₀ del cultivo más H₂O₂, sin que se alcanzaran lecturas de DO₆₀₀ iguales a las del medio MH. Esto sugiere la existencia de algún compuesto o compuestos limitantes para la actividad antimicrobiana. La MIC alcanzada con imipenem fue de 2.12 µg ml⁻¹.

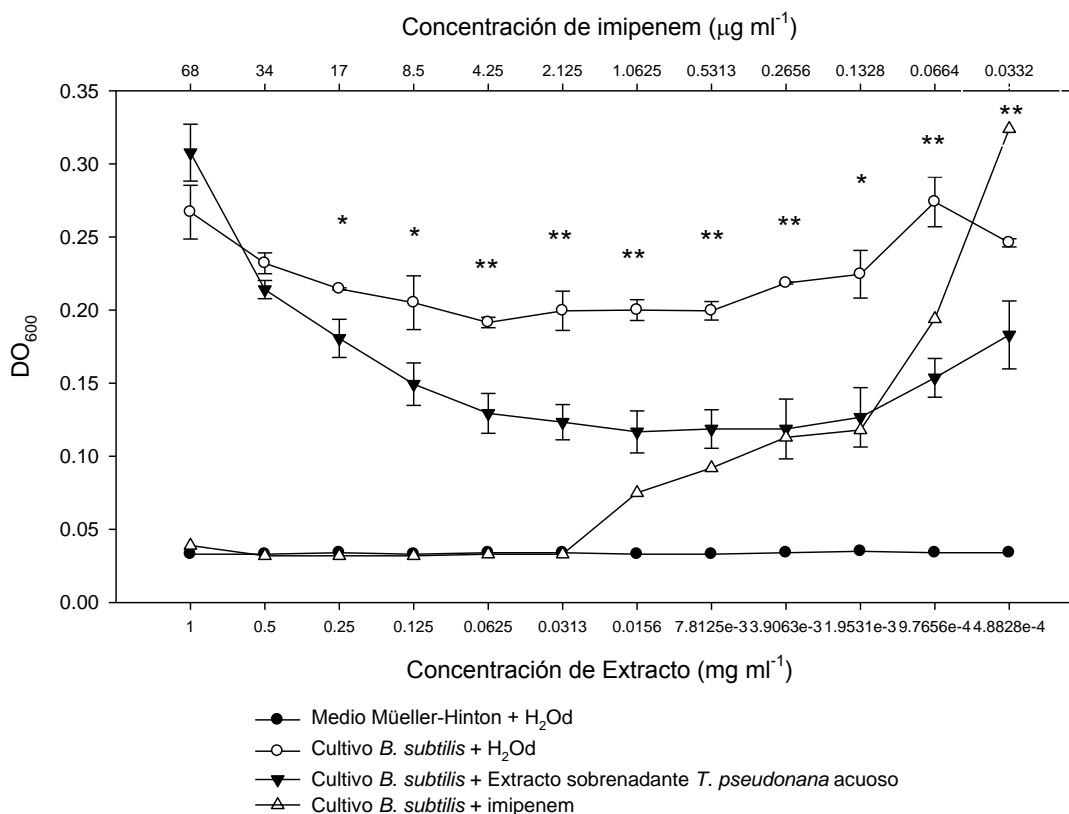


Figura 28. Efecto del extracto acuoso del sobrenadante de *T. pseudonana* sobre el cultivo de *B. subtilis*. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.05$: * y $P < 0.01$: **.

La Figura 29 muestra los cambios en la actividad antimicrobiana del extracto proveniente de la fase acuosa del sobrenadante de *T. pseudonana* sobre el cultivo de *B. subtilis*. Los valores promedio obtenidos de DO₆₀₀ del cultivo de *B. subtilis* más extracto, presentaron diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) a concentraciones de 1.00 y 0.50 mg ml^{-1} de extracto con respecto a los valores promedio de DO₆₀₀ del cultivo de *B. subtilis* más H₂Od. Por lo tanto, los resultados mostraron que dos de las concentraciones del extracto acuoso promovieron el crecimiento de *B. subtilis*. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas ($P > 0.05$) en las diez concentraciones restantes. La MIC alcanzada con imipenem fue de 4.25 $\mu\text{g ml}^{-1}$

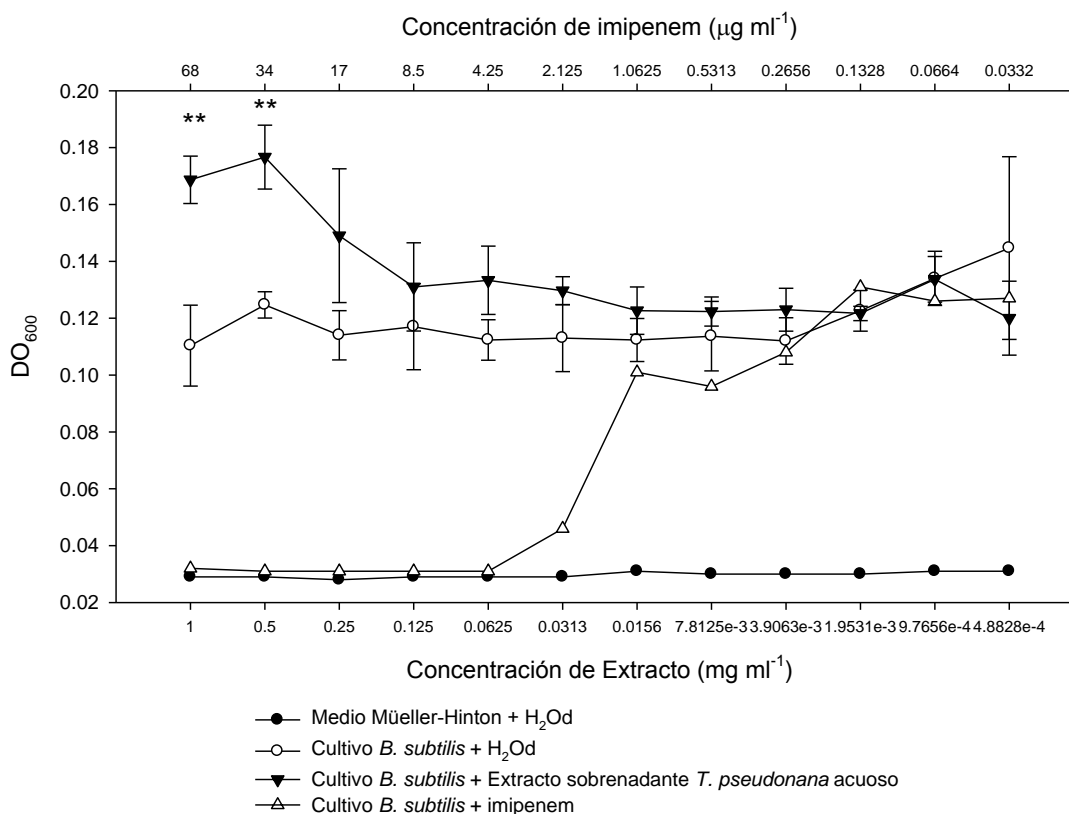


Figura 29. Cambios en la actividad antimicrobiana del extracto acuoso del sobrenadante de *T. pseudonana* sobre el cultivo de *B. subtilis* por efecto del tiempo de almacenamiento y manipulación. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.01$:.**

El último extracto acuoso a probar contra el cultivo de *B. subtilis* fue el proveniente del sobrenadante de la cianobacteria *Synechocystis* sp. (Figura 30). Los valores promedio obtenidos de DO₆₀₀ del cultivo de *B. subtilis* más extracto, presentaron diferencias (muy altamente significativas, $P < 0.001$; altamente significativas, $P < 0.01$ y significativas, $P < 0.05$) a partir de 0.06 mg ml⁻¹ de extracto con respecto a los valores promedio de DO₆₀₀ del cultivo más H₂Od, sin que se alcanzaran lecturas de DO₆₀₀ iguales a las del medio MH. Estos resultados sugieren que existe algún compuesto o compuestos limitantes para la actividad antimicrobiana en el mismo extracto. El imipenem tuvo una MIC de 2.12 µg ml⁻¹.

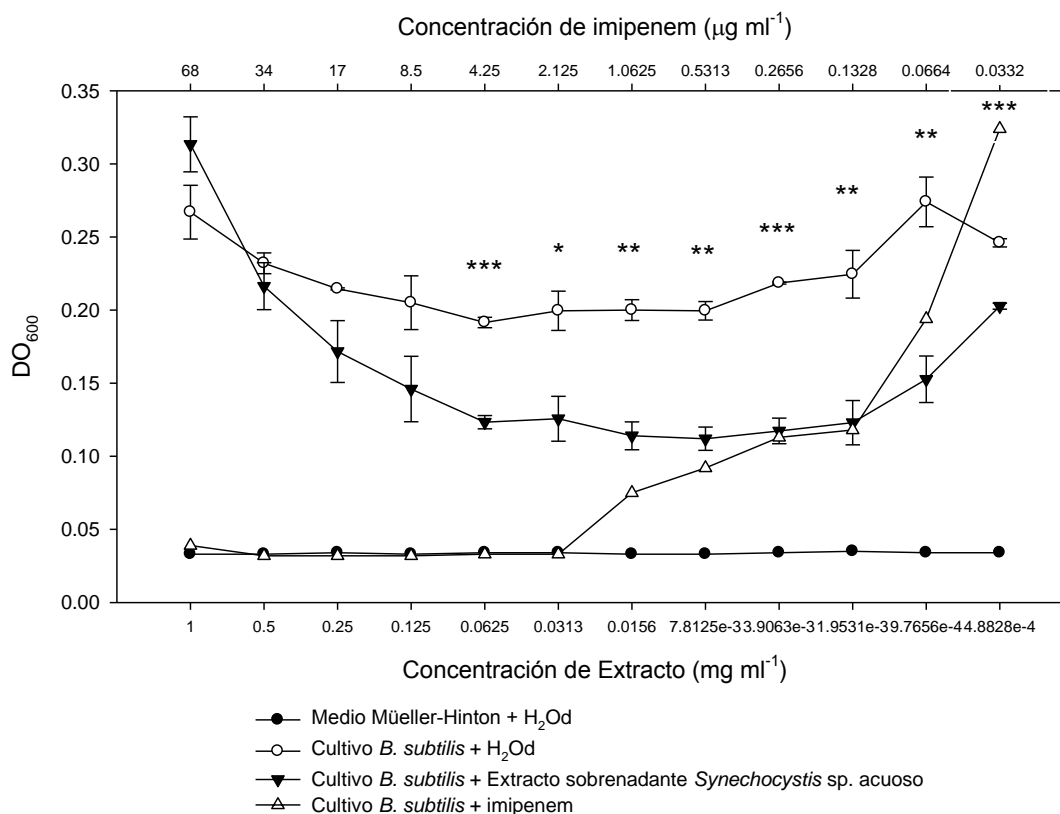


Figura 30. Efecto del extracto acuoso del sobrenadante de *Synechocystis* sp. sobre el cultivo de *B. subtilis*. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.001$:*; $P < 0.01$:** y $P < 0.05$:*.**

La Figura 31 muestra los cambios en la actividad antimicrobiana del extracto acuoso proveniente del sobrenadante de *Synechocystis* sp. sobre el cultivo de *B. subtilis*. Los valores promedio obtenidos de DO₆₀₀ del cultivo de *B. subtilis* más extracto, presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$ y $P < 0.001$) a las concentraciones de 1.00, 0.50 y 0.25 mg ml^{-1} con respecto a los valores promedio de DO₆₀₀ del cultivo de *B. subtilis* más H₂O. El extracto a estas concentraciones incrementó el crecimiento de *B. subtilis* y perdió la capacidad de inhibir el crecimiento de esta bacteria. Sin embargo no se obtuvieron diferencias significativas ($P > 0.05$) en las concentraciones restantes. El imipenem tuvo una MIC de 2.12 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

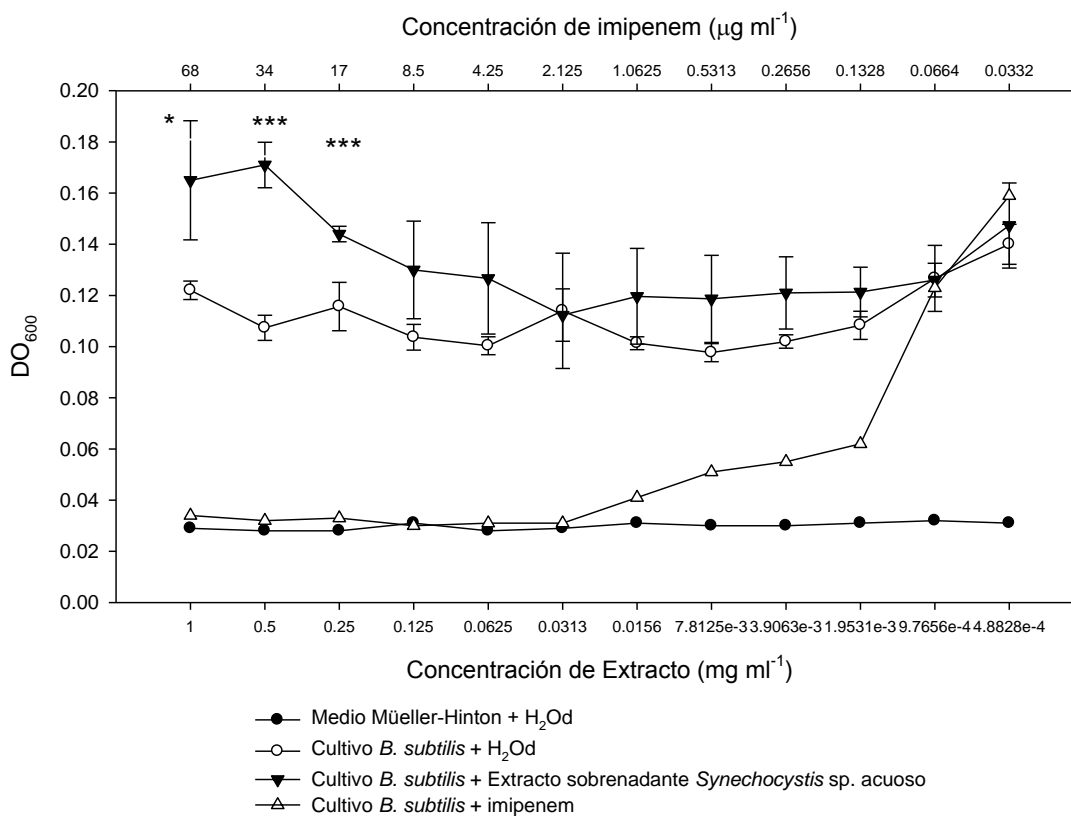


Figura 31. Cambios en la actividad antimicrobiana del extracto acuoso del sobrenadante de *Synechocystis* sp. sobre el cultivo de *B. subtilis* por efecto del tiempo de almacenamiento y manipulación. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.05$:*; $P < 0.001$:*.**

7.8. Ensayos de biotoxicidad empleando como modelo a *Artemia franciscana*

Finalmente se evaluó el posible efecto tóxico de los extractos de cianobacterias y microalgas que presentaron actividad antimicrobiana sobre nauplios de *Artemia*.

Como tratamiento control positivo de toxicidad, se utilizó al SDS (surfactante) cuyo valor de $LC_{50-24\text{ h}}$, de acuerdo a Vanhaecke *et al.* (1981), se ubica entre 13.3-19.9 mg l^{-1} . En nuestros ensayos se obtuvo un valor de $LC_{50-24\text{ h}}$ para el SDS de 16.8 mg l^{-1} , el cual quedó dentro del rango sugerido por el autor. Se utilizó DMSO (concentración inicial de 1.3%) y agua desionizada estéril, (dependiendo del tipo de extracto a evaluar orgánico o acuoso), como tratamientos control de toxicidad nula. Cada uno con un promedio de porcentaje de mortalidad a las 24 horas de 3.5% y de 0.0% respectivamente.

Los primeros extractos a los que se les evaluó su toxicidad fueron los que presentaron actividad antimicrobiana contra *E. coli* (Figura 32). Los valores promedio del porcentaje de mortalidad de nauplios de *A. franciscana* con extractos de biomasa de *N. oculata* con cloroformo y del sobrenadante de *D. tertiolecta* con diclorometano, no presentaron diferencias significativas ($P>0.05$) en ninguna de las concentraciones probadas, al compararse con los valores promedio del porcentaje de mortalidad de nauplios de *A. franciscana* con DMSO. Por lo tanto, ninguno de los extractos orgánicos mostró toxicidad contra *A. franciscana*.

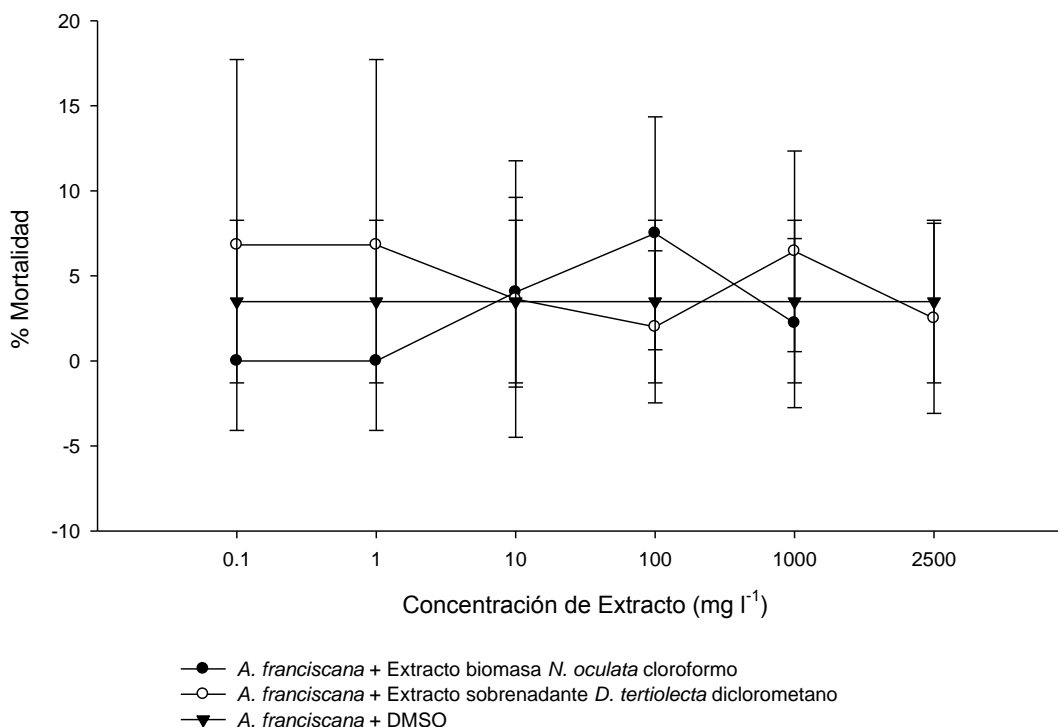


Figura 32. Evaluación de la toxicidad del extracto de *N. oculata* y de *D. tertiolecta* contra nauplios de *A. franciscana*. Las barras indican la desviación estándar.

Al comparar los valores promedio del porcentaje de mortalidad de los nauplios de *A. franciscana* más el extracto del sobrenadante de *N. thermalis* var. *minor*, con los valores promedio del porcentaje de mortalidad de los nauplios más DMSO no se presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en las concentraciones de 0.1 a 250 mg l⁻¹ de extracto (Figura 33). Sin embargo, al incrementarse la concentración de extracto a 500 y 1000 mg l⁻¹ se observaron diferencias muy altamente ($P < 0.001$) y altamente ($P < 0.01$) significativas al comparar el porcentaje de mortalidad del extracto contra el tratamiento control. El valor de LC_{50-24 h} para el extracto de *N. thermalis* var. *minor* fue de 773.4 mg l⁻¹. Dicho valor fue corroborado utilizando una escala semilogarítmica para la concentración de extracto.

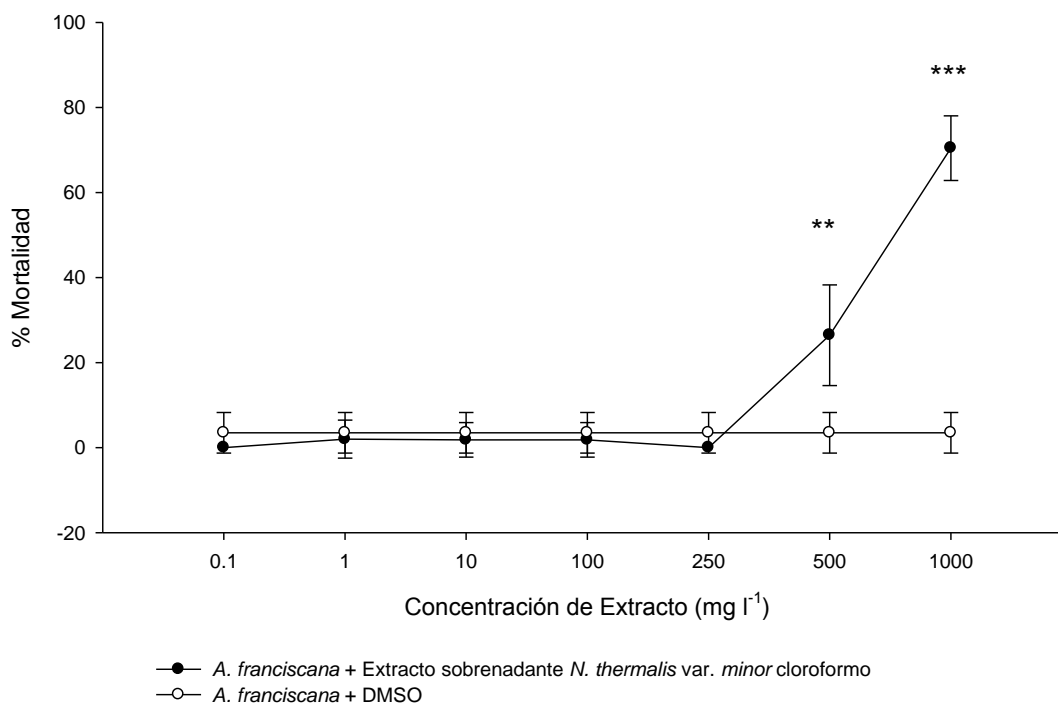


Figura 33. Evaluación de la toxicidad del extracto de *N. thermalis* var. *minor* contra nauplios de *A. franciscana*. Las barras indican la desviación estándar. $P < 0.001$:* y $P < 0.01$:**.**

Se evaluó la toxicidad de los extractos acuosos de *Chaetoceros* sp., *Isochrysis* sp., *N. oculata*, *T. pseudonana* y *Synechocystis* sp. que presentaron actividad antimicrobiana contra *B. subtilis* (Figura 34). Los valores promedio del porcentaje de mortalidad de los nauplios de *A. franciscana* en presencia de los cinco extractos acuosos, no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en ninguna de las concentraciones probadas, al compararse estos valores con el promedio del porcentaje de mortalidad de los nauplios de *A. franciscana* con H₂O. Ninguno de los cinco extractos acuosos resultó tóxico para *A. franciscana* bajo las condiciones experimentales probadas.

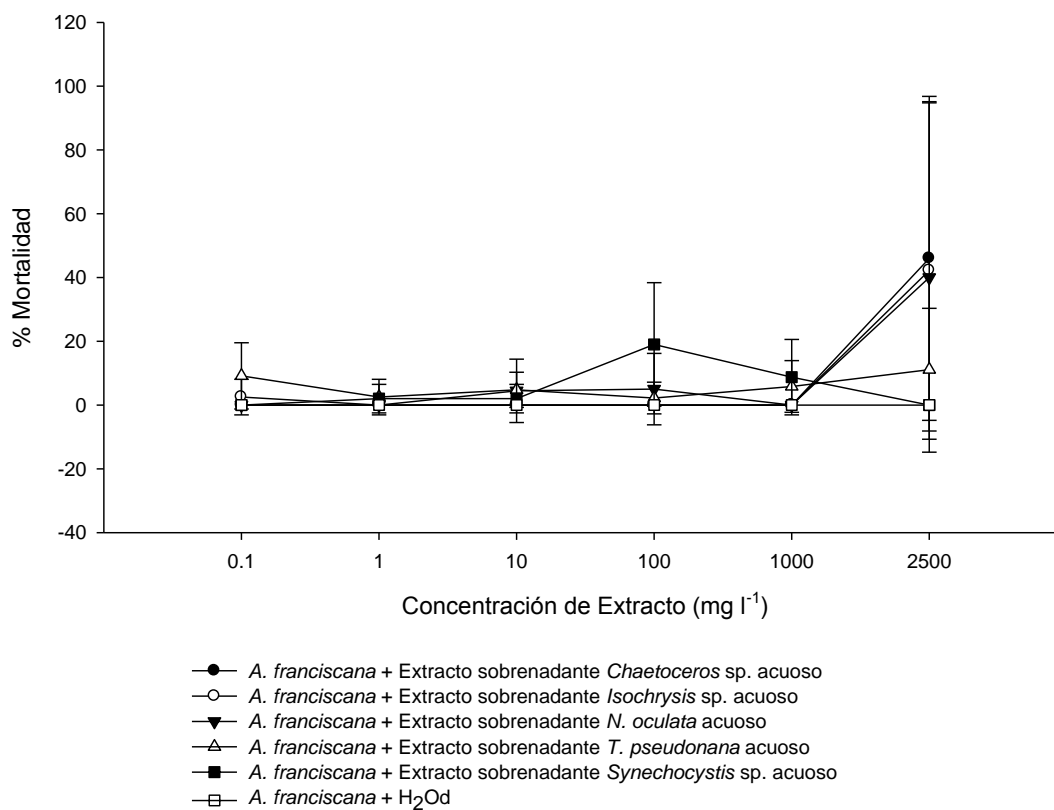


Figura 34. Evaluación de la toxicidad del extracto de *Chaetoceros* sp., *Isochrysis* sp., *N. oculata*, *T. pseudonana* y *Synechocystis* sp. contra nauplios de *A. franciscana*. Las barras indican la desviación estándar.

8. Discusión

Dado que existen diversos métodos para evaluar *In vitro* la susceptibilidad de los microorganismos contra agentes antimicrobianos, en este tipo de pruebas es importante considerar la estandarización de la concentración celular, con el fin de evitar un crecimiento excesivo y por lo tanto, utilizar concentraciones grandes del compuesto para inhibir el crecimiento de los microorganismos (Ramirez y Marin, 2009). Por lo que el estándar comúnmente utilizado por los laboratorios de microbiología clínica para las pruebas de rutina de la susceptibilidad antimicrobiana es de 1.5 a 2.0×10^8 UFC ml^{-1} para los ensayos de difusión en placa y 1.5 a 2.0×10^5 CFU ml^{-1} para los ensayos de microdilución en caldo (Lalitha, 2004; Bou, 2007).

En este estudio, se caracterizaron las curvas de crecimiento de los diferentes microorganismos prueba (las bacterias Gram-negativas *E. coli* y *P. aeruginosa*, la bacteria Gram-positiva *B. subtilis* y la levadura *C. albicans*). Los cultivos en lote tuvieron un incremento en el número de células, dependiente del tamaño del inóculo y del estado metabólico en el que se encontraban las células (Fogg y Thake, 1987), por lo que en todas las curvas de crecimiento realizadas en este estudio se observaron distintas fases de crecimiento en relación a las condiciones del cultivo y al tiempo. Las variaciones de los tiempos de duplicación de los cuatro microorganismos se vieron influenciadas no sólo por el microorganismo en sí, sino también por el medio de cultivo utilizado y por las condiciones de incubación, como ha sido descrito anteriormente (Madigan *et al.*, 1995).

Uno de los factores más importantes en la búsqueda de productos naturales es la selección de un disolvente adecuado para solubilizar extractos orgánicos, ya que éste puede ser tóxico para los organismos de ensayo, lo que puede influir en la evaluación de su actividad (Randhawa, 2008; Wadhvani *et al.*, 2009).

El DMSO fue utilizado como disolvente en este estudio, debido a que es una molécula anfipática que posee un dominio altamente polar y dos grupos metilo apolar, lo que lo hace soluble tanto en medios acuosos como en medios orgánicos. Es uno de los disolventes más comunes para la administración *in vivo* de varias sustancias insolubles en agua, utilizándose como vehículo para la terapia de drogas (Santos *et al.*, 2003). Sin embargo, debido a que se ha reportado que el DMSO actúa como inhibidor del crecimiento de bacterias (bacteriostático, lo cual se ha sugerido se debe a una pérdida de la conformación de la estructura del ARN necesaria para llevar a cabo la síntesis de proteínas) y hongos, se requirió encontrar la concentración del solvente que pudiera usarse para resuspender los extractos sin que interfiera con los bioensayos (Jacob y Herschler, 1986; Wadhvani *et al.*, 2009).

Los ensayos realizados con el panel de microorganismos prueba para la búsqueda de la MIC del DMSO, se iniciaron con una concentración del solvente del 9.99%. Los resultados mostraron que ninguna de las concentraciones de DMSO fue tóxica para *C. albicans*, contrario a lo reportado por Randhawa (2008), quien utilizando el método de dilución en caldo (glucosa peptona) probó diferentes concentraciones de DMSO del 1.25% al 10% con tres cepas diferentes de *C. albicans* (concentración final de 1×10^7 UFC ml⁻¹). Encontrando que la concentración del 10% inhibió completamente el proceso de germinación de estas levaduras al incubarlas a 37°C durante 3 h. A concentraciones de 2.5, 5.0 y 7.5% de DMSO el efecto inhibitorio fue lineal respecto a la dosis del solvente, mientras que el efecto no difirió significativamente del tratamiento control (agua destilada estéril) al utilizar 1.25% de DMSO.

En el caso de *P. aeruginosa*, el crecimiento de esta bacteria se vió afectado al utilizar una concentración de DMSO del 9.99%, contrario a lo ocurrido con la otra bacteria Gram-negativa (*E. coli*) cuyo crecimiento no se vió afectado por ninguna de las concentraciones probadas del solvente. Wood y Wood (1975) encontraron

que cuando el medio de cultivo contenía una concentración relativamente alta de DMSO (20%) el crecimiento de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, se inhibía.

Al probar concentraciones del 1 al 6% de DMSO sobre el crecimiento de *S. epidermidis*, *Pseudomonas oleovorans*, *V. cholerae*, *Shigella flexneri* y *Salmonella paratyphi*, se observó que todas las bacterias exhibieron una disminución significativa en su crecimiento al exponerse a concentraciones por arriba del 4% de DMSO (Wadhvani *et al.*, 2009). Asimismo, el DMSO disminuyó el crecimiento del cultivo de *V. campbelli* M1 (medio Müeller-Hinton, 1.5×10^5 UFC mL⁻¹) a partir de una concentración inicial del 9.99%, siendo muy sensible esta bacteria Gram-negativa (MIC de 0.31%) al efecto antimicrobiano de dicho solvente (González-Davis, 2010).

El microorganismo *B. subtilis* fue el más sensible a la acción del DMSO con una MIC del 0.62%, por lo que, la concentración máxima del DMSO utilizada para solubilizar los extractos de biomasa y sobrenadante fue del 1.3%. Esto evitó enmascarar el efecto antimicrobiano presente en los extractos en los ensayos del método de difusión en placa y microdilución (ya que la concentración máxima final de DMSO fue del 0.13%).

Los resultados obtenidos en este trabajo corroboran la importancia de seleccionar el disolvente y la concentración adecuados para cada microorganismo prueba antes de llevar a cabo la evaluación de la actividad antimicrobiana de cada cepa (Wadhvani *et al.*, 2009).

Asimismo, la selección de un antibiótico que inhibiera el crecimiento de los microorganismos prueba, fue fundamental para ser utilizado como control positivo de los ensayos antimicrobianos.

Torres-Ariño en 2001, evaluó extractos de cianobacterias marinas con posible actividad antimicrobiana. Para la selección de un antibiótico control utilizó doce antibióticos comerciales contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y levaduras, obteniendo que todas las cepas en mayor o menor grado fueron susceptibles al efecto del imipenem. Esto debido a que el imipenem es un antibiótico beta-lactámico de amplio espectro, que se encuentra clasificado dentro del grupo de los carbapenems; actúa interfiriendo la síntesis de la pared celular de bacterias Gram-positivas y principalmente Gram-negativas, lo que provoca la elongación y la lisis de las células bacterianas, además posee alta resistencia a la acción de las β -lactamasas (Elander, 2003; Remington, 2006; Seth y Seth, 2009).

En este trabajo se realizó la selección de un antibiótico control utilizando gentamicina (concentración inicial de $120 \mu\text{g ml}^{-1}$) e imipenem (concentración inicial de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$). Los resultados de las curvas de dosis:respuesta de la gentamicina (datos no mostrados), presentaron un efecto nulo sobre el crecimiento de cada uno de los microorganismos de prueba. Sin embargo, al utilizar imipenem se observó que todos los microorganismos fueron susceptibles a su acción. Dado que el imipenem es especialmente potente contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* y especies de *Enterococcus* (Elander, 2003; Remington, 2006; Seth y Seth, 2009), no es de sorprender que la cepa de *P. aeruginosa* haya sido el microorganismo más sensible a la acción de este medicamento con una MIC de $0.098 \mu\text{g ml}^{-1}$ y *B. subtilis* fuera el microorganismo más resistente con una MIC de $0.391 \mu\text{g ml}^{-1}$. Por lo que el imipenem fue un buen antibiótico control de la inhibición del crecimiento de estos microorganismos para los ensayos de antibiosis con extractos de cianobacterias y microalgas.

Debido a que los metabolitos secundarios se acumulan en cantidades muy pequeñas dentro de la célula y su distribución es restringida comparada con la de los metabolitos primarios, es de suma importancia el uso de técnicas de extracción eficientes para su aislamiento (Sasson, 1991; Spooft *et al.*, 2003; Morrison *et al.*,

2006). La concentración de compuestos activos en extractos crudos en general es muy baja (1:1000) (Schweder *et al.*, 2005). Dentro de los factores que influyen en la eficiencia de los procesos de extracción se encuentran: el contenido de agua en las células (material liofilizado, recién congelado ó descongelado), las variantes celulares (células con o sin pared celular, unicelulares, filamentosas), el tipo de cultivo (de campo o laboratorio), la polaridad y función de los metabolitos de interés, así como la del solvente (Fastner *et al.*, 1998; Mendiola-León, 2008).

El hexano, el cloroformo, el diclorometano, el metanol y el etanol, así como sus mezclas (entre sí o con agua) son los solventes más utilizados para la extracción de metabolitos secundarios a partir de la biomasa de microalgas y cianobacterias (Torres-Ariño, 2001; Mundt *et al.*, 2003; Venkatesan *et al.*, 2007; Sánchez-Saavedra *et al.*, 2010). En el caso de González-Davis *et al.* (2012), se utilizó una mezcla de metanol:ácido acético (30:1) con muestras de biomasa de 28 especies de microalgas y cianobacterias (las mismas utilizadas en esta investigación), que produjo extractos orgánicos sin actividad antibacterial contra *V. campbelli* M1. Con la estrategia planteada en este trabajo donde se utilizó la biomasa liofilizada y el sobrenadante de los cultivos de microalgas y cianobacterias empleando tres diferentes polaridades de solventes, se amplió la posibilidad de extraer compuestos no sólo a nivel intracelular sino extracelular con actividad antimicrobiana y biotóxica.

A menudo se reporta el peso del extracto como unidad de biomasa seca empleada para la extracción de metabolitos con actividad antimicrobiana (Østensvik *et al.*, 1998; Torres-Ariño, 2001; Zheng *et al.*, 2001; Venkatesan *et al.*, 2007; Chlipala *et al.*, 2009; Sánchez-Saavedra *et al.*, 2010; González-Davis *et al.*, 2012) y no el peso de la masa obtenida en sí, al evaporar los solventes. Sin embargo, en este trabajo se calculó no sólo el peso de cada uno de los extractos, sino también, el rendimiento total de los extractos con actividad antimicrobiana, los cuales fueron de 6.67, 20, 20, 9640, 18480, 20060, 27420 y 37450 $\mu\text{g ml}^{-1}$ con las

siguientes especies de fitoplancton: *Nannochloropsis oculata* (cloroformo), *Dunaliella tertiolecta*, *Nitzschia thermalis* var. *minor*, *Thalassiosira pseudonana*, *Chaetoceros* sp., *Nannochloropsis oculata* (agua), *Isochrysis* sp. y *Synechocystis* sp. Rendimientos de extracto mayores a $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, hacen que las especies de fitoplancton sean consideradas con potencial para la producción de compuestos con actividad antimicrobiana (Dra. Irma E. Soria Mercado, comunicación personal). De acuerdo a los datos obtenidos en este trabajo, los extractos orgánicos de *D. tertiolecta* y *N. thermalis* var. *minor* pudieran ser candidatos para realizar la purificación y caracterización de los compuestos presentes en ellos. Asimismo, los cinco extractos acuosos, podrían tener potencial para caracterizar los compuestos que les confieren actividad antibacteriana. Sin embargo, se debe de considerar que el rendimiento de los extractos acuosos incluye el peso de las sales del agua de mar. En este trabajo, el uso de tres solventes con diferentes polaridades amplió el rango de compuestos con estructuras químicas diversas que tuvieron algún efecto antimicrobiano. La actividad antibacteriana contra *E. coli* del extracto de *N. oculata* obtenido con cloroformo, posiblemente se deba a metabolitos intracelulares no polares como los ácidos grasos. El extracto obtenido con diclorometano de *D. tertiolecta*, probablemente presentó compuestos con estructuras químicas de fenoles, flavonoides o alcaloides lo cual le confiere un efecto antibacteriano a nivel extracelular contra *E. coli*. Así mismo, la inhibición del crecimiento de *C. albicans* utilizando el extracto de *N. thermalis* var. *minor* obtenido con cloroformo podría asociarse a metabolitos extracelulares como esteroides y ácidos grasos. La estructura de los compuestos que se encuentran asociados a la actividad antibacteriana contra *B. subtilis* a partir de extractos acuosos, quizá se deba a péptidos y/o proteínas que han sido liberadas al medio de cultivo donde crecieron *Chaetoceros* sp., *Isochrysis* sp., *N. oculata*, *T. pseudonana* y *Synechocystis* sp.

La técnica de difusión en agar ha sido ampliamente utilizada para evaluar extractos (principalmente de plantas) con actividad antimicrobiana. El presente

trabajo nos permitió evaluar la susceptibilidad de un microorganismo a un compuesto, dando como resultado una zona de inhibición del crecimiento en la cual la magnitud de dicha inhibición se relaciona con la concentración de la sustancia (Selvakumar *et al.*, 1999; Lalitha, 2004; Ramirez y Marin, 2009). Al evaluar la actividad antimicrobiana de los 168 extractos contra el panel de microorganismos patógenos de prueba por el método de difusión en placa, se encontró que ocho extractos inhibieron el crecimiento de *E. coli*, *C. albicans* y *B. subtilis*, siendo este último, el microorganismo más susceptible a la acción de estos metabolitos, ya que cinco de los ocho extractos presentaron halos de inhibición. *Bacillus subtilis* también resultó ser la bacteria más sensible a la acción de los extractos obtenidos con hexano, diclorometano y metanol a partir de la biomasa de diferentes especies de fitoplancton (Sánchez-Saavedra *et al.*, 2010). Sin embargo, *P. aeruginosa* fue resistente a todos los extractos, contrario a lo reportado por Sánchez-Saavedra *et al.* (2010) quienes obtuvieron halos de inhibición de esta bacteria con extractos a partir de la biomasa de *Porphyridium cruentum* y de *Amphiprora paludosa* con diclorometano y metanol respectivamente. Así mismo, al realizar extracciones con metanol de la biomasa de *Lingulodinium polyedrum* (dinoflagelado) se obtuvieron halos de inhibición contra *P. aeruginosa* (Sánchez-Saavedra *et al.*, 2011).

Dentro del grupo de las Bacillariophyceas: *Chaetoceros*, *Nitzschia* y *Thalassiosira* son las especies que han mostrado mayor actividad antimicrobiana según reporta Pesando (1990), lo cual se corrobora con los resultados obtenidos en este estudio, ya que en tres diferentes especies de estos géneros se obtuvieron extractos con una amplia actividad antimicrobiana que abarcó bacterias Gram-positivas y levaduras. Los extractos obtenidos a partir de la biomasa de *Dunaliella* sp. con diclorometano han mostrado inhibir el crecimiento de bacterias Gram-negativas (Krishnika *et al.*, 2011). Esto coincide con el hecho de que el extracto obtenido del sobrenadante de *D. tertiolecta* con diclorometano presentara actividad antibacteriana contra *E. coli*, ampliando la tendencia para este mismo género de

Chlorophyceae de inhibir no solo el crecimiento de bacterias Gram-positivas (Pesando, 1990; Sánchez-Saavedra *et al.*, 2010). Extractos generados a partir de la biomasa de *Nannochloropsis* sp. con hexano, metanol, etanol y agua fría han presentado actividad antibacteriana contra bacterias Gram-negativas (Krishnika *et al.*, 2011), siendo semejante el resultado que se obtuvo con el extracto a partir de la biomasa de *N. oculata* que inhibió el crecimiento de *E. coli*. Sin embargo, el extracto acuoso del sobrenadante de esta misma especie de fitoplancton presentó actividad contra *B. subtilis*, lo cual nos indica que dependiendo del tipo de muestra, los extractos de esta Eustigmatophyceae presentan actividad contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Estudios previos con extractos de *Isochrysis* sp. han mostrado actividad contra bacterias Gram-negativas (Krishnika *et al.*, 2011; González-Davis *et al.*, 2012). En este sentido, nuestros resultados mostraron únicamente actividad contra bacterias Gram-positivas, ampliando con ello el espectro de acción de extractos generados a partir de esta especie de Prasinophyceae. El extracto acuoso a partir del sobrenadante de *Synechocystis* sp. sólo presentó actividad antimicrobiana contra *B. subtilis*. No obstante para esta especie de Cyanophyceae existen reportes que sustentan la presencia de compuestos con actividad antibacteriana de amplio espectro (Sánchez-Saavedra *et al.*, 2010) y contra bacterias Gram-negativas empleando como solvente al etanol (Krishnika *et al.*, 2011). Ninguno de los miembros del grupo de las Rhodophyceae, mostró actividad antimicrobiana a pesar de tener reportes que indican que *Porphyridium cruentum* posee actividad antimicrobiana de amplio espectro (Sánchez-Saavedra *et al.*, 2010; González-Davis *et al.*, 2012). Así mismo, ninguna especie de las Prasinophyceae presentó actividad contra los microorganismos utilizados en este estudio pese a que Krishnika *et al.* (2011) reportaron actividad contra bacterias Gram-negativas por parte de *Tetraselmis* sp. Todo esto sugiere que las condiciones de extracción como el tipo de solvente y el tipo de muestra son factores a considerar en la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Es importante señalar que el tamaño del halo de inhibición en los ensayos de difusión en agar está influenciado por factores

como: el medio de cultivo en el que se realiza el ensayo, la cantidad de inóculo, el tiempo de generación del microorganismo, el periodo de incubación, la capacidad de difusión del compuesto así como la sensibilidad a este por parte de los microorganismos de prueba (Ramirez y Marin, 2009). En este sentido, el método de microdilución aumentó la precisión del ensayo al evaluar diferentes concentraciones de extracto. Asimismo, el método de microdilución permite evaluar un mayor número de condiciones experimentales por prueba reduciendo el costo y agilizando el procesamiento de las muestras (Ramirez y Marin, 2009). Al evaluar la actividad antimicrobiana de los tres extractos orgánicos (*N. oculata*, *D. tertiolecta* y *N. thermalis* var. *minor*) contra *E. coli* y *C. albicans* y los extractos acuosos (*T. pseudonana*, *Chaetoceros* sp., *N. oculata*, *Isochrysis* sp. y *Synechocystis* sp) contra *B. subtilis* utilizando este método, se observó que los extractos promovieron de manera significativa ($P < 0.05$) la disminución de las lecturas de DO_{600} de los cultivos de dichos microorganismos a las 24 h de realizado el ensayo. Sin embargo, los valores de las lecturas nunca alcanzaron la significancia de las DO_{600} del medio Müller-Hinton solo, contrario al efecto bactericida exhibido por el imipenem. Esto se atribuye probablemente a la poca cantidad del compuesto con actividad antimicrobiana presente en los extractos y a que se evaluaron extractos crudos. Así mismo, la disminución e incluso pérdida de actividad antimicrobiana mostrada por los extractos en los diferentes ensayos realizados a lo largo de este trabajo, evidenció el efecto negativo de congelar y descongelar las muestras varias veces después de almacenarlos por un mes a -20°C y sugiere la importancia de almacenar cantidades pequeñas de los extractos (alícuotas) a bajas temperaturas. El hecho de que algunos extractos pudieran perder la capacidad de disminuir el crecimiento de *E. coli* y de *C. albicans*, pero promovieran el crecimiento de *B. subtilis* a concentraciones altas de los extractos acuosos, sugiere cambios químicos y estructurales importantes en los componentes activos. En este sentido, se ha descrito que algunos ácidos grasos libres, los poliinsaturados, particularmente de cadena larga pueden ser inestables y tienden a unirse inespecíficamente a proteínas u otros compuestos. En el caso

de las proteínas, la oxidación de las cadenas de aminoácidos puede resultar en cambios conformacionales y por lo tanto en la pérdida de su actividad (Desbois y Smith, 2010), siendo una fuente adicional de nitrógeno que bien pudo ser asimilada por *B. subtilis*. Así mismo, el incremento en las MICs del imipenem con cada uno de los microorganismos de prueba a lo largo del tiempo, corroboró el carácter termolábil de este antibiótico (Lalitha, 2004).

Es importante destacar que siete de los ocho extractos obtenidos con actividad antimicrobiana provinieron de muestras de sobrenadantes de microalgas, siendo que los principales reportes sobre metabolitos extracelulares con actividad antimicrobiana provienen de cianobacterias (Noaman *et al.*, 2004) mostrando que estos compuestos son del tipo de diterpenoides (Jaki *et al.*, 2000), péptidos antimicóticos (Jaki *et al.*, 2001), alcaloides y compuestos fenólicos (Volk y Furkert, 2006). La naturaleza, así como los mecanismos de acción antimicrobiana de la mayoría de los compuestos liberados por las microalgas aún permanecen poco claros, a pesar del gran potencial que representan para la obtención de nuevos fármacos, siendo contados los trabajos en los que se ha llegado a realizar la identificación de metabolitos con actividad antimicrobiana. En las microalgas, la actividad antibacteriana ha sido atribuida en parte, a los ácidos grasos insaturados de longitud de cadena superior a diez átomos de carbono, tal es el caso del ácido eicosapentaenoico (EPA) de *Phaeodactylum tricornutum*, que posee actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, incluyendo una cepa múltiple resistente de *S. aureus* (Desbois *et al.*, 2009). Fracciones lipídicas que contienen ácidos grasos insaturados, se recuperaron de *Skeletonema costatum* (Naviner *et al.*, 1999) y de *Chaetoceros muelleri (gracilis)* (Mendiola *et al.*, 2007) y de *Haematococcus pluvialis* (Rodríguez-Meizoso *et al.*, 2010) mediante la extracción con fluidos supercríticos. Así mismo, se ha encontrado actividad antibacteriana y antifúngica proveniente de ácidos grasos obtenidos a través de extracciones con líquidos presurizados de *Chlorella vulgaris* (Plaza *et al.*, 2012). Pese a ello, el mecanismo exacto que subyace a la acción bactericida de

los ácidos grasos en microalgas y cianobacterias aún queda por dilucidar. Sin embargo, al parecer promueven el daño de la membrana que con el tiempo provoca que el contenido celular se libere, además de la reducción en la absorción de nutrientes y la inhibición de la respiración celular (Desbois *et al.*, 2009). La potencia antibacteriana de los ácidos grasos libres por lo general aumenta con la insaturación de la cadena de carbono y con la presencia, número, posición y orientación de los dobles enlaces. Los enlaces dobles en los ácidos grasos libres insaturados normalmente tienen orientación *cis*, los cuales tienden a presentar una mayor actividad antibacteriana que los que poseen una orientación *trans*. Esto posiblemente se deba a que la orientación *trans* en los ácidos grasos libres insaturados es similar a la estructura de los ácidos grasos libres saturados, los cuales presentan una menor actividad antibacteriana (Desbois *et al.*, 2008; Desbois y Smith, 2010). Alternativamente se ha sugerido que la acción de productos secundarios de la degradación de los ácidos grasos libres es la responsable de su actividad antibacteriana. La peroxidación por moléculas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales como el hidroxilo (OH) y el anión superóxido (O_2^-), o la autooxidación de los ácidos grasos libres insaturados crea oxilipinas y aldehídos de cadena corta, que tienen actividad antibacteriana propia (Desbois y Smith, 2010). En este sentido, Marshall *et al.* (2003) afirman que las especies de oxígeno reactivo juegan un papel como co-factor en la toxicidad de ácidos grasos libres, como el ácido eicosapentanoico (EPA), al encontrar que la toxicidad de este ácido graso se incrementa tres veces en la presencia del anión superóxido. Se considera que los mecanismos específicos mediante los cuales cada ácido graso libre causa la inhibición del crecimiento bacteriano y/o la muerte dependen de su estructura, de la bacteria diana y de los sitios que a los que el ácido graso puede acceder (Desbois y Smith, 2010).

Las ficobiliproteínas y lectinas son las proteínas de algas que muestran el mayor potencial bioactivo. Las lectinas pueden reconocer y unirse a estructuras específicas de carbohidratos, sin embargo, son pocas las lectinas de algas que

han sido caracterizadas, mostrando secuencias de aminoácidos altamente novedosos. La mayoría de estas proteínas parecen ser termoestables, de bajo peso molecular y exhiben afinidad por oligosacáridos o glicoproteínas. A las lectinas de macroalgas se les han atribuido actividad antibacteriana, mitogénica, citotóxica, antiinflamatoria, de anti-adherencia, anti-VIH, en la reducción de la sensibilidad al dolor y en la inhibición de la agregación plaquetaria humana (Stengel *et al.*, 2011). En cambio, los péptidos bioactivos contienen generalmente de 3 a 20 residuos de aminoácidos y su actividad está basada en su secuencia y composición de aminoácidos. Dependiendo de la secuencia de aminoácido, estos compuestos pueden estar implicados en diversas funciones biológicas tales como antihipertensivos, agonistas o antagonistas de opioides, inmunomoduladores, antioxidantes antitrombóticos, actividades anticáncer y antimicrobiana, además de su utilización como nutrientes. Algunos péptidos bioactivos han demostrado actividades multifuncional en función de su estructura y otros factores como la hidrofobicidad, la carga o las propiedades de unión de microelementos (Se-Kwon y Wijesekara, 2010). Los péptidos antimicrobianos son por lo general de bajo peso molecular (menores a 10 kDa), siendo el caso de dos tridecapéptidos cíclicos novedosos que se aislaron del medio del cultivo de la cianobacteria *Tolypothrix byssoidea*. Ambos péptidos contienen el aminoácido no natural dehidrohomoalanina (Dhha), así como aminoácidos proteinogénicos aunque con configuración D o L, estos compuestos presentan actividad antifúngica moderada contra la levadura *C. albicans* (Jaki *et al.*, 2001).

El ensayo de *Artemia* spp., permitió realizar una primera prueba de evaluación para categorizar la toxicidad de los compuestos químicos presentes en los extractos de microalgas y cianobacterias, y determinar así su efecto letal, ya que pudieran tener potencial para producir la muerte de células cancerígenas en cultivo de tejidos, matar insectos y/o ejercer un amplio rango de efectos farmacológicos (Pino y Jorge, 2010). El método de McLaughlin (1991) para determinar la toxicidad de extractos utilizando como modelo de estudio a *Artemia*

es un buen indicador de la toxicidad de los compuestos, presentando un coeficiente de correlación del 90% con líneas celulares, es decir, que el 90% de los compuestos que son tóxicos para *Artemia* también son tóxicos para células de cáncer humano. Siendo este un método considerado como rápido, simple y de bajo costo en el que se emplea un mínimo de muestra. El uso combinado de los ensayos biológicos como el de *Artemia*, en conjunto con las tecnologías de separación y elucidación estructural actuales, coadyuva al descubrimiento de compuestos altamente promisorios para el desarrollo de nuevos productos con una amplia actividad biológica (Pino y Jorge, 2010). En este trabajo, se evaluó la toxicidad de los ocho extractos que presentaron actividad antimicrobiana, debido a que a menudo los compuestos bioactivos son tóxicos a concentraciones generalmente necesarias para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. Dado que *A. franciscana* es uno de los organismos utilizados para alimentar etapas larvales de crustáceos y peces de interés comercial, el ensayo de toxicidad también permitiría inferir el potencial de las especies de fitoplancton que producen compuestos con actividad antimicrobiana como fuente de probióticos, no interfiriendo con el crecimiento, reproducción, supervivencia y estado de salud de estas especies (González-Davis, 2010).

Los resultados obtenidos a partir del ensayo de toxicidad con nauplios de *A. franciscana*, mostraron que las especies de microalgas que presentaron actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *B. subtilis* y que incluyen organismos de las clases de Bacillariophyceas planctónicas, Chlorophyceas, Eustigmatophyceas, Primnesiophyceas y Cyanophyceas, no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) al comparar el porcentaje de mortalidad obtenido con los extractos y con los tratamientos utilizados como control (agua desionizada estéril y DMSO) a pesar de que las Chlorophyceas sintetizan compuestos (glicoproteínas y vitaminas) que se ha reportado poseen actividad antitumoral (Hoa *et al.*, 2011). Sin embargo, la excepción en cuanto a los resultados obtenidos en este ensayo fue el extracto del sobrenadante de *N. thermalis var. minor* con cloroformo, pues no sólo

presentó actividad antimicrobiana contra *C. albicans*, sino también fue tóxico para nauplios de *A. franciscana*, obteniéndose un valor de $LC_{50-24\text{ h}}$ de 773.4 mg l^{-1} . En este ensayo, la falta de movilidad de los nauplios de *Artemia* observada a los 10 s se definió como la muerte de los mismos. El cribado de toxicidad empleando a *Artemia* es principalmente utilizado en la búsqueda de toxinas provenientes de cianobacterias (Lahti *et al.*, 1995; Jaki *et al.*, 1999; Mian *et al.*, 2003; Osswald *et al.*, 2007; Hisem *et al.*, 2011), existiendo pocos trabajos con microalgas (a excepción de los dinoflagelados) a pesar de ser organismos prometedores en el descubrimiento de compuestos con actividad anticancerígena. En este sentido, Hoa *et al.* (2011) encontraron actividad citotóxica contra líneas celulares de carcinoma epidérmico humano (KB) y carcinoma hepatocelular (HepG2) a partir de extractos con metanol:cloroformo (1:1) de la biomasa (fase estacionaria) de *Ankistrodesmus gracilis* (Chlorophyceae) y de *Amphiprora alata* (Bacillariophyceae). Se ha sugerido que la producción de los compuestos con actividad tóxica en algunas especies de fitoplancton responde a la competencia por la luz y los nutrientes, lo cual sería ventajoso para ciertas especies si viven en entornos de recursos limitados, lo que indicaría adaptaciones especie-específicas (Scholz y Liebezeit, 2012). Los extractos de microalgas y cianobacterias marinas obtenidos en este trabajo, podrían ser utilizados como recurso para la producción, purificación e identificación de compuestos con actividad antimicrobiana y biotóxica.

Utilizando los extractos directamente o aislando sus compuestos químicos, es posible sintetizarlos químicamente para crear medicamentos que imiten la actividad y cuya obtención sea más barata. Sin embargo, el número y concentración de compuestos activos difiere entre cada especie de fitoplancton, por lo que puede ser posible encontrar efectos que los principios activos no pueden justificar por sí solos y cuya explicación radique en los efectos sinérgicos que produce su combinación con componentes secundarios, que a menudo

juegan un papel importante con el principio activo central, por lo que si se aíslan es posible modificar o eliminar el efecto (Galindo *et al.*, 2010).

9. Conclusiones

Los ensayos realizados con diferentes concentraciones de DMSO con los cuatro microorganismos prueba (*E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*), permitieron determinar la concentración de DMSO máxima a utilizar para resuspender los extractos (6.2%), siendo *B. subtilis* el microorganismo más sensible a este solvente.

Los extractos con agua, cloroformo o diclorometano que presentaron actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *B. subtilis* y *C. albicans* se obtuvieron de al menos un organismo de cada clase de Bacillariophyceas, Chlorophyceas, Eustigmatophyceas, Primmnesiophyceas y Cyanophyceas.

La bacteria Gram-negativa *P. aeruginosa* presentó resistencia a los 168 extractos provenientes de microalgas y cianobacterias.

El 87.5% de los extractos que presentaron actividad antimicrobiana provinieron de muestras de sobrenadantes y sólo el 37.5% se obtuvo a partir de solventes orgánicos, lo que sugiere la presencia de compuestos activos principalmente polares.

Ninguno de los extractos evaluados presentó actividad antimicrobiana de amplio espectro.

Las especies de fitoplancton con los mayores rendimientos para la obtención de extractos orgánicos con actividad antimicrobiana fueron *D. tertiolecta* y *N. thermalis* var. *minor* con 20 µg ml⁻¹ cada una.

El ensayo de microdilución evidenció que el almacenar los extractos a -20°C , así como congelar y descongelar las muestras varias veces, inactivó y/o modificó los componentes activos de los extractos, provocando la pérdida de la actividad antimicrobiana.

El extracto del sobrenadante de *N. thermalis* var. *minor* con cloroformo, presentó actividad antimicrobiana contra *C. albicans* y fue tóxico para nauplios de *A. franciscana* con un valor de $\text{LC}_{50-24 \text{ h}}$ de 773.4 mg l^{-1} .

10. Perspectivas

Aumentar la cantidad de especies de microorganismos a utilizar en los ensayos, para conocer el espectro de inhibición de los compuestos producidos por las especies de fitoplancton utilizadas en este estudio.

Evaluar el posible efecto tóxico contra *A. franciscana* de los extractos que no presentaron actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *B. subtilis*, *C. albicans* y *P. aeruginosa*.

Evaluar la posible actividad citotóxica de los extractos de microalgas y cianobacterias marinas utilizadas en este estudio con líneas celulares de cáncer.

Dializar las muestras de los extractos acuosos para calcular el rendimiento real de los extractos eliminando así la masa de las sales del agua de mar.

Identificar y caracterizar los compuestos producidos por las distintas especies de microalgas y cianobacterias marinas que presentaron actividad antimicrobiana y que tuvieron un buen rendimiento de producción, mediante técnicas cromatográficas como la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) o cromatografía de gases y realizar estudios que permitan elucidar el mecanismo de acción y toxicidad del compuesto de interés.

11. Literatura citada

Abed, R.M.M., Dobretsov, S., Sudesh, K. 2009. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*. 106(1): 1–12 p.

Barrios-Llerena, M.E., Burja, A.M., Wright, P.C. 2007. Genetic analysis of polyketide synthase and peptide synthetase genes in cyanobacteria as a mining tool for secondary metabolites. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 34(6): 443–456 p.

Bhadury, P., Wright, P.C. 2004. Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications. *Planta*. 219(4): 561–578 p.

Bou, G. 2007. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Analysis and Susceptibility Testing of MRSA. En: J. Yinduo (ed.), *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Protocols: Methods in Molecular Biology*. New York, NY, Humana Press. 29-49 pp.

Burja, A.M., Banaigs, B., Abou-Mansour, E., Grant, B.J., Wright, C.P. 2001. Marine cyanobacteria-a prolific source of natural products. *Tetrahedron*. 57(46): 9347-9377 p.

Campbell, N.A., Reece, J.B. 2007. *Biología*. Madrid, Panamericana. 1165 pp.

Cardllina, I.I., Moore, R.E., Arnold, E.V., Clardy, I. 1979. Structure and absolute configuration of malyngolide, an antibiotic from the marine blue-green alga *Lyngbya majuscula* Gomont. *Journal of Organic Chemistry*. 44(23): 4039–4042 p.

Carmichael, W.W. 1994. The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*. 270(1): 64-72 p.

Chlipala, G., Mo, S., Carcache de Blanco, E.J., Ito, A., Bazarek, S., Orjala, J. 2009. Investigation of antimicrobial and protease-inhibitory activity from cultured cyanobacteria. *Pharmaceutical Biology*. 47(1): 53–60 p.

Demain, A.L. 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 52(4): 455-463 p.

Desbois, A.P., Lebl, T., Yan, L., Smith, V.J. 2008. Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81(4): 755–764 p.

Desbois, A.P., Mearns-Spragg, A., Smith, V.J. 2009. A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus*. *Marine Biotechnology*. 11(1): 45-52 p.

Desbois, A.P., Smith, V.J. 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85(6): 1629–1642 p.

Dexter, A.F., Garson, M.J., Hemling, M.E. 1993. Isolation of a novel bastadin from the temperate marine sponge *Lanthella* sp. *Journal of Natural Products*. 56(5): 782-786 p.

Elander, R.P. 2003. Industrial production of beta-lactam antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61(5-6): 385-392 p.

El Gamal, A.A. 2010. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 18(1): 1-25 p.

El-Sheekh, M.M., Osman, M.E.H., Dyab, M.A., Amer, M.S. 2006. Production and characterization of antimicrobial active substance from the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 21(1): 42–50 p.

Fastner, J., Flieger, I., Neumann, U. 1998. Optimised extraction of microcystins from field samples: a comparison of different solvents and procedures. *Water Research*. 32(10): 3177-3181 p.

Fogg, G.E., Thake, B. 1987. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. Madison, Wisconsin, The University of Wisconsin Press. 320 pp.

Fusetani, N., Kem, W. 2009. *Marine Toxins and Research Tools*. Progress in Molecular and Subcellular Biology. Berlin, Springer. 259 pp.

Gademann, K., Portmann, C. 2008. Secondary Metabolites from Cyanobacteria: Complex Structures and Powerful Bioactivities. *Current Organic Chemistry*. 12(4): 326-341 p.

Galindo, L.A., Pultrini, A. de M., Costa, M. 2010. Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil. *Journal of Natural Medicines*. 64(4): 436–441 p.

Gerwick, W.H., Mrozek, C., Moghaddam, M.F., Agarwal, S.K. 1989. Novel cytotoxic peptides from tropical marine cyanobacterium *Hormothamnion enteromorphoides*. 1. Discovery, isolation, and initial chemical and biological characterization of the hormothamnins from wild and cultures material. *Experientia*. 45(2): 115-121 p.

González-Davis, O. 2010. Bioprospección de cianobacterias y microalgas como agentes de biocontrol contra *Vibrio campbellii* M1 y su uso en el cultivo de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 93 pp.

Recuperada de:

<http://www.biblioteca.cicese.mx>

González-Davis, O., Ponce-Rivas, E., Sánchez-Saavedra, M.P., Muñoz-Márquez, M.E., Gerwick, W.H. 2012. Bioprospection of microalgae and cyanobacteria as biocontrol agents against *Vibrio campbellii* and their use in white shrimp *Litopenaeus vannamei* culture. *Journal of the World Aquaculture Society*. 43(3): 387-399 p.

Graham, L.E., Wilcox, L.W. 2000. Cyanobacteria (Chloroxybacteria). En: *Algae*. Chapter 6. Prentice Hall, Inc. Saddle River, NJ, USA. 97-131 pp.

Guillard, R.R.L., Ryther, J.H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*. 8(2): 229-239 p.

Hisem, D., Hrouzek, P., Tomek, P., Tomsícková, J., Zapomelová, E., Skácelová, K., Lukesová, A., Kopecký, J. 2011. Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicity to brine shrimp *Artemia salina*. *Toxicon*. 57(1): 76-83 p.

Hoang, L.T.P., Quang, D.N., Ha, N.T.H., Tri, N.H. 2011. Isolating and screening mangrove microalgae for anticancer activity. *Research Journal of Phytochemistry*. 5(3): 156-162 p.

Jacob, S.W., Herschler, R. 1986. Pharmacology of DMSO. *Cryobiology*. 23(1): 14-27 p.

Jaki, B., Orjala, J., Bürgi, H.R., Sticher, O. 1999. Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharmaceutical Biology*. 37(2): 138-143 p.

Jaki, B., Orjala, J., Heilmann, J., Linden, A., Vogler, B., Sticher, O. 2000. Novel extracellular diterpenoids with biological activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of Natural Products*. 63(3): 339–343 p.

Jaki, B., Zerbe, O., Heilmann, J., Sticher, O. 2001. Two novel cyclic peptides with antifungal activity from the cyanobacterium *Tolypothrix byssoidea* (EAWAG 195). *Journal of Natural Products*. 64(2): 154-158 p.

Kellam, S.J., Walker, J.M. 1989. Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture. *British Phycolological Journal*. 24(2): 191-194 p.

Kreitlow, S., Mundt, S., Lindequist, U. 1999. Cyanobacteria—a potential source of new biologically active substances. *Journal of Biotechnology*. 70(1-3): 61–63 p.

Krishnika, A., Bhanupriya, P.B., Beena, B.N. 2011. Antibacterial activity of eight marine microalgae against a few gram negative bacterial pathogens. *Journal of Pharmacy Research*. 4(9): 3024-3026 p.

Lahti, K., Ahtiainen, J., Rapai, J., Sivonen, K., Niemi, S.I. 1995. Assessment of rapid bioassays for detecting cyanobacterial toxicity. *Letters in Applied Microbiology*. 21(2): 109-114 p.

Lalitha, M.K. 2004. *Manual on Antimicrobial Susceptibility Testing*. Vellore, Tamil Nadu. Association of Medical Microbiologists. 47 pp.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 1995. Brock: Biología de los microorganismos. Madrid, Prentice Hall. 1011 pp.

Maeda, M., Nogami, K., Kanematsu, M., Hirayama, K. 1997. The concept of biological control methods in aquaculture. *Hydrobiology*. 358(1-3): 285-290 p.

Marris, E. 2006. Marine natural products: drugs from the deep. *Nature*. 443(7114): 904-905 p.

Marshall, J.A., Nichols, P.D., Hamilton, B., Lewis, R.J., Hallegraeff, G.M. 2003. Ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) to damselfish (*Acanthochromis polyacanthus*): the synergistic role of reactive oxygen species and free fatty acids. *Harmful Algae*. 2(4): 273-281 p.

McLaughlin, J.L. 1991. Crow Gall Tumors on Potato Discs and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassays for Higher Plant Screening and Fractionation. En: K. Hostettmann (ed.), *Methods in Plant Biochemistry*. London, Academic Press. 1-29 pp.

Mendiola, J.A., Torres, C.F., Toré, A., Martín-Álvarez, P.J., Santoyo, S., Arredondo, B.O., Señoráns F.J., Cifuentes, A., Ibáñez, E. 2007. Use of supercritical CO₂ to obtain extracts with antimicrobial activity from *Chaetoceros muelleri* microalga. A correlation with their lipidic content. *European Food Research and Technology*. 224(4): 505–510 p.

Mendiola-León, J.A. 2008. Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Química-Física Aplicada, Madrid. 152 pp.

Recuperada de:
<http://digital.csic.es/>

Metting, B., Pyne, J.W. 1986. Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme and Microbial Technology*. 8(7): 386-394 p.

Mian, P., Heilmann, J., Bürgi, H.-R., Sticher, O. 2003. Biological screening of terrestrial and freshwater cyanobacteria for antimicrobial activity brine shrimp lethality, and citotoxicity. *Pharmaceutical Biology*. 41(4): 243-247 p.

Miao, S.C., Anderson, R.J., Allen, T.M. 1990. Cytotoxic metabolites from the sponge *Lanthella basta* collected in Papua New Guinea. *Journal of Natural Products*. 53(6): 1441-1446 p.

Morrison, L.F., Parkin, G., Codd, G.A. 2006. Optimization of anabaenopeptin extraction from cyanobacteria and the effect of methanol on laboratory manipulation. *Peptides*. 27(1): 10–17 p.

Mundt, S., Kreitlow, S., Jansen, R. 2003. Fatty acids with antibacterial activity from the cyanobacterium *Oscillatoria redekei* HUB 051. *Journal of Applied Phycology*. 15(2-3): 263–267 p.

Naviner, M., Bergé, J.P., Durand, P., Le Bris, H. 1999. Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. *Aquaculture*. 174(1): 15-24 p.

Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Schaechter, M. 1990. *Physiology of the bacterial cell a Molecular Approach*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates. 507 pp.

Noaman, N.H., Fattah, A., Khaleafa, M., Zaky, S.H. 2004. Factors affecting antimicrobial activity of *Synechococcus leopoliensis*. *Microbiological Research*. 159(4): 395-402 p.

Østensvik, Ø., Skulberg, O.M., Underdal, B., Hormazabal, V. 1998. Antibacterial properties of extracts from selected planktonic freshwater cyanobacteria – a comparative study of bacterial bioassays. *Journal of Applied Microbiology*. 84(6): 1117–1124 p.

Osswald, J., Rellán, S., Gago, A., Vasconcelos, V. 2007. Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environment International*. 33(8): 1070–1089 p.

Parke, M., Dixon, P.S. 1976. Check-list of British marine algae-third revision. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 56(3): 527-594 p.

Pesando, D. 1990. Antibacterial and antifungal activities of marine algae. En: I. Akatsuka (ed.), *Introduction to Applied Phycology*. The Hague, SPB Academic. 3-26 pp.

Pino, P.O., Jorge L.F. 2010. Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*. 22(1): 34-43 p.

Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Avalo, B., Cifuentes, A., Reglero, G., García-Blairsy, R.G., Señoráns, F.J., Ibáñez, E. 2012. Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. *LWT-Food Science and Technology*. 46(1): 245-253 p.

Pomponi, S.A. 1999. The potential for the marine biotechnology industry. En: B. Cicin-Sain, R. W. Knecht, N. Foster, *Trends and Future Challenges for U. S. National Ocean and Coastal Policy*. Washington, D. C., Center for the Study of Marine Policy, University of Delaware and National Ocean Service, NOAA. 101-104 pp.

Ramirez, L.S., Marin, C.D. 2009. Metodologías para evaluar *In vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*. 15(42): 263-268 p.

Randhawa, M.A. 2008. Dimethyl sulfoxide (DMSO) Inhibits the germination of *Candida albicans* and the Arthrospores of *Trycophyton mentagrophytes*. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi: Japanese Journal of Medical Mycology*. 49(2): 125-128 p.

Rastogi, R.P., Sinha, R.P. 2009. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 27(4): 521–539 p.

Remington, J.P. 2006. *The Science and practice of Pharmacy*. Washington, D. C., Lippincott Williams & Wilkins. 1355 pp.

Rodríguez-Meizoso, I., Jaime, L., Santoyo, S., Señoráns, F.J., Cifuentes, A., Ibáñez, E. 2010. Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 51(2): 456-463 p.

Sánchez-Saavedra, M.P., Licea-Navarro, A.F., Bernáldez-Sarabia, J. 2010. Evaluation of the antibacterial activity of different species of phytoplankton. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 45(3): 531-536 p.

Sánchez-Saavedra, M.P., Licea-Navarro, A.F., Bernáldez-Sarabia, J. 2011. Actividad antibacteriana de *Lingulodinium polyedrum*. Simposio Internacional de Microbiología Médica. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Ensenada, Baja California. México. 14 de Noviembre. Presentación en poster.

Santos, N.C., Figueira-Coehlo, J., Martins-Silva, J., Saldanha, C. 2003. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, celular and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology*. 65(7): 1035-1041 p.

Sasson, A. 1991. Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures: biotechnological and economic aspects. En: Y. Demarly (ed.), *Options Méditerranéennes Série A Séminaires Méditerranéens*. Zaragoza, Centre International de Hautes Études Agronomiques Méditerranéennes, International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies. 59-74 pp.

Scholz, B., Liebezeit, G. 2012. Screening for biological activities and toxicological effects of 63 phytoplankton species isolated from freshwater, marine and brackish water habitats. *Harmful Algae*. doi.org/10.1016/j.hal.2012.07.007.

Schweder, T., Lindequist, U., Lalk, M. 2005. Screening for new metabolites from marine microorganisms. En: R. Ulber, Y. Le Gal (ed.), *Marine Biotechnology I*. Berlin, Springer. 1-48 pp.

Se-Kwon, K., Wijesekara, I. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*. 2(1): 1-9 p.

Selvakumar, D., Dey, S., Das, D. 1999. Production and bioassay of bialaphos biosynthesized by *Streptomyces hygroscopicus* NRRL B-16256. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 20(5): 459–462 p.

Seth, S.D., Seth, V. 2009. Textbook of Pharmacology. Noida, UP, India, Elsevier. 568-569 pp.

Shimizu, Y. 2003. Microalgal metabolites. *Current Opinion in Microbiology*. 6(3): 236-243 p.

Shirahama, K. 1942. On the unsaponifiable matter and phosphatides in marine algae fat. En: *Journal of the Faculty of Agriculture*. Hokkaido, Hokkaido University. 1-93 pp.

Sieburth, J.M. 1960. Acrylic acid, an “antibiotic” principle in phaeocystis blooms in antarctic waters. *Science*. 132(3428): 676-677 p.

Sieburth, J.M. 1964. Antibacterial substances produced by marine algae. En: F.E. Round (ed.), *The Ecology of Algae*. New York, NY, Cambridge University Press. 196 pp.

Skulberg, O.M. 2000. Microalgae as a source of bioactive molecules—experience from cyanophyte research. *Journal of Applied Phycology*. 12(3-5): 341–348 p.

Spoof, L., Vesterkvist, P., Lindholm, T., Meriluoto, J. 2003. Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1020(1): 105–119 p.

Stanier, R.Y., Cohen-Bazire, G. 1977. Phototrophic prokaryotes: The cyanobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 31(1): 225-274 p.

Stengel, D.B., Connan, S., Popper, Z.A. 2011. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances*. 29(5): 483–501 p.

Taylor, F.J.R. 1980. Basic biological features of phytoplankton cells. En: I. Morris (ed.), *Physiological Ecology of Phytoplankton*. Berkeley, University of California Press. 1276 pp.

Tong, T.L. 2010. Filamentous tropical marine cyanobacteria: a rich source of natural products for anticancer drug discovery. *Journal of Applied Phycology*. 22(5): 659-676 p.

Torres-Ariño, A. 2001. Aislamiento y caracterización de cianobacterias marinas productoras de compuestos de interés biomédico. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Ensenada, Baja California. Ensenada, México. 94 pp.

Vanhaecke, P., Persoone, G., Claus, C., Sorgeloos, P. 1981. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 5(3): 382-387 p.

Venkatesan, R., Karthikayen, R., Periyannayagi, R., Sasikala, V., Balasubramanian, T. 2007. Antibacterial activity of the marine diatom, *Rhizosolenia alata* (Brightwell, 1858) against human pathogens. *Research Journal of Microbiology*. 2(1): 98-100 p.

Volk, R.B., Furkert, F.H. 2006. Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. *Microbiological Research*. 161(2): 180-186 p.

Wadhvani, T., Desai, K., Patel, D., Lawani, D., Bahale, P., Joshi, P., Kothari, V. 2009. Effect of various solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials. *The internet Journal of Microbiology*. doi: 10.5580/b43.

Wood, D.C., Wood, J. 1975. Pharmacologic and Biochemical considerations of Dimethyl Sulfoxide. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 243(1): 7-19 p.

Zheng, Y., Chen, Y.S., Lu, H.-S. 2001. Screening for antibacterial and antifungal activities in some marine algae from the Fujian coast of China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 19(4): 327-331 p.

Zuluaga, A.F., Agudelo, M., Rodriguez, C.A., Vesga O. 2009. Application of microbiological assay to determine pharmaceutical equivalence of generic intravenous antibiotics. *BMC Clinical Pharmacology*. 9(1): 1-11 p.

Recuperado de:

The Global Antibacterials Market: R&D Pipelines, Market Analysis and Competitive Landscape. 2007. http://www.reportlinker.com/p0158348/The-Global-Antibacterials-Market-RD-Pipelines-Market-Analysis-and-Competitive-Landscape.html#utm_source=prnewswire&utm_medium=pr&utm_campaign=prnewswire

Anexos

Elaboración de la Curva estándar de McFarland

Preparar una solución de BaCl_2 0.048 M ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 1.175% p/v) y una solución de H_2SO_4 0.18 M (0.36 N) (1% v/v).

Realizar las mezclas en las siguientes proporciones:

Tabla A1. Curva estándar de McFarland (Turbidimetría)

Escala de McFarland	1.175% BaCl_2 (ml)	1% H_2SO_4 (ml)	Número de bacterias representadas (10^8) ml^{-1}
0.5	0.05	9.95	1.5
1	0.10	9.90	3
2	0.20	9.80	6
3	0.30	9.70	9
4	0.40	9.60	12
5	0.50	9.50	15
6	0.60	9.40	18
7	0.70	9.30	21
8	0.80	9.20	24
9	0.90	9.10	27
10	1.00	9.00	30

Determinar la absorbancia a una longitud de onda de 625 nm.

Pesar 0.1175 g de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y resuspender en 10 ml de agua desionizada estéril.

Para la solución de H_2SO_4 (1% v/v) adicionar 1 ml de ácido sulfúrico a 99 ml de aguas desionizada estéril.

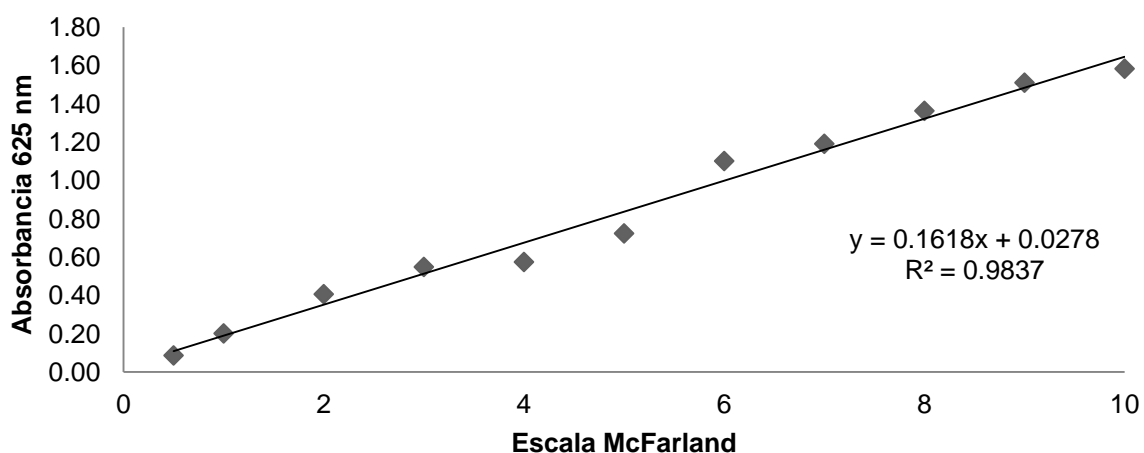


Figura A1. Curva estándar de McFarland

Preparación del estándar 0.5 McFarland

Para estandarizar la densidad del inóculo se usa una suspensión de sulfato de bario (0.5 de la escala de MacFarland) como estándar.

Preparación del estándar de turbidez.

1. Agregar 0.05 ml de una solución de BaCl_2 0.048 M ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 1.175% p/v) a 9.95 ml de una solución de H_2SO_4 0.18 M (0.36 N) (1% v/v) en constante movimiento para mantener la suspensión.
2. Verificar la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro, cuya absorbancia a 625 nm debe de estar entre 0.08 a 0.10 para el estándar 0.5 de McFarland.
3. Ajustar bien las tapas o tapones y conservarlos en la oscuridad a temperatura ambiente y anotar la fecha de preparación.
4. Antes de ser usado agitar vigorosamente dicho estándar de preferencia, en un agitador mecánico.
5. Verificar mensualmente la densidad de los estándares de sulfato de bario, y reemplazarlo cuando sea necesario.