



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DETECCIÓN DE ACTIVIDAD
ANTIBIOTICA EN CULTIVOS DE
MICROALGAS EN DOS FASES DE
CRECIMIENTO

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

PRESENTA

HIDROBIOLOGA:
CLAUDIA ALCO CER MORALES



División de Ciencias Biológicas y de la Salud

México, D.F., Julio 2012



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ANTIBIOTICA EN CULTIVOS DE
MICROALGAS EN DOS FASES DE CRECIMIENTO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA

HIDROBIOLOGA: CLAUDIA ALCO CER MORALES

TUTOR:

M. en C. Cruz Lozano Ramírez

CO – TUTOR:

Dr. Ricardo Vázquez Perales



División de Ciencias Biológicas y de la Salud

México, D.F., Julio 2012



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

POSGRADO: DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

COMITÉ TUTORAL:

M. en C. Cruz Lozano Ramírez

Laboratorio de Ficología Aplicada UAM-I

Dr. Ricardo Vázquez Perales

Universidad Iberoamericana Puebla

LECTOR DE TESIS:

M. en B. Mónica Cristina Rodríguez Palacio

Laboratorio de Ficología Aplicada UAM-I



AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a varias personas:

Iniciare con mis padres, mis hermanos y mis sobrinos por todo el apoyo y cariño en todo momento.

A mis compañeros del laboratorio por el apoyo y travesuras que pasamos juntos durante esta etapa. Se acuerdan??

A mis amigos mil GRACIAS por estar !!!

A mi tutor, el maestro Cruz Lozano, por la paciencia, tiempo y conocimiento compartido, a mi co-tutor el doctor Ricardo Vásquez, así también a la maestra Mónica Rodríguez por su invaluable apoyo.

Y finalmente a Fundación Produce Puebla FUPPA por el apoyo brindado durante el desarrollo del presente trabajo a través de la beca adquirida mediante el proyecto titulado "Producción de microalgas para la obtención de aceites y otros derivados, evaluando diferentes sistemas de producción en estanques y reactores de columnas".

Gracias !!!

Claudia Alcocer Morales

The end of a perfect day Is find the soul of a new friend!!!

Anónimo

INDICE

I.	RESUMEN	8
II.	SUMMARY	9
III.	INTRODUCCIÓN.....	11
IV.	GENERALIDADES	14
	4.1 Cianobacterias o algas verde azules	14
	4.2 Clorofitas o algas verdes	15
	4.3 Bacterias: características principales	16
V.	ANTECEDENTES.....	21
VI.	HIPOTESIS.....	25
VII.	OBJETIVOS.....	27
	7.1 OBJETIVO GENERAL.....	27
	7.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	27
VIII.	MATERIAL Y METODO	30
	8.1 ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS.....	30
	8.2 ESTERILIZACIÓN QUÍMICA	32
	8.3 MEDIO DE CULTIVO.....	32
	8.4 PARÁMETROS DE LOS CULTIVOS	33
	8.5 COSECHA.....	33
	8.6 PRUEBAS DE ANTIBIOSIS	33
	8.6.1 CULTIVO DE BACTERIAS	33
	8.6.2 EXTRACTO DE LA BIOMASA ALGAL	34
	8.6.3 PREPARACIÓN DE DISCOS	38

8.6.4 ANTIBIOGRAMAS	39
IX. RESULTADOS	41
9.1 TASA DE CRECIMIENTO	41
9.2 BIOENSAYOS.....	41
X. DISCUSION	47
XI. CONCLUSION.....	51
XII. BIBLIOGRAFIA.....	54

I. RESUMEN

El presente trabajo evaluó la actividad antibiótica de 58 extractos obtenidos mediante dos métodos de extracción A (butanol:metanol:agua) y B (metanol y agua) de 9 especies de microalgas cosechadas en fase exponencial y estacionaria. *Spirulina subsalsa*, *Chlorella miniata*, *C. vulgaris.*, *C. kessleri*, *Oedogonium sp.*, *Scenedesmus dimorphus*, *S. obliquus*, *S. quadricauda* y *C. capsulata*. cultivadas a un volumen de 16 litros. Los extractos fueron probados ante 6 bacterias Gram + (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633) y Gram – (*Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Salmonella thyphimurium*) mediante la técnica difusión de placa o agar. De las 9 especies de microalgas ensayadas sólo una (*Scenedesmus quadricauda*) presentó efecto antibacteriano, siendo *Pseudomonas aeruginosa* sensible ante el extracto acuoso de *S. quadricauda*.

Palabras clave: actividad antibiótica, microalgas, cultivos, ficología aplicada.

II. SUMMARY

The present study evaluates the antibiotic activity of 58 extracts by two extraction methods A (butanol:metanol:water) and B (metanol and water) of 9 microalgal species harvested during exponential and stationary phases. *Spirulina subsalsa*, *Chlorella miniata*, *C. vulgaris.*, *C. kessleri*, *Oedogonium sp.*, *Scenedesmus dimorphus*, *S. obliquus*, *S. quadricauda* and *C. capsulate*. These algae were growth to a volume of 16 liters. The extracts were tested against Gram + (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633) and Gram – (*Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Salmonella thyphimurium*) using the agar diffusion technique. Only aqueous extract from *Scenedesmus quadricauda* showed antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa*. All other extracts no showed any effect.

Keywords: antibiotic activity, microalgae, microalgae cultures, applied phycology.



INTRODUCCIÓN

III. INTRODUCCIÓN

Las algas unicelulares representan un porcentaje notable dentro del fitoplancton de los océanos y cuerpos de agua dulces, donde se lleva a cabo no menos del 50% del total de la fotosíntesis que se realiza en nuestro planeta, convirtiéndose en una fuente renovadora del oxígeno de la atmósfera terrestre (Gama, 2004).

Las microalgas se caracterizan por ser fotosintéticas, de gran variedad morfológica (unicelulares o formando filamentos, cadenas, colonias o cenobios) y por habitar todos los cuerpos de agua donde existan las condiciones más simples para crecer (Abalde *et al.*, 1995; Lara *et al.*, 1996).

Sin embargo, las microalgas también se caracterizan por producir moléculas bioactivas. En los últimos años se ha incrementado el interés por la búsqueda de compuestos bioactivos en organismos acuáticos. Numerosas revisiones señalan a las algas como uno de los principales productores de compuestos bioactivos, en algunos casos con estructuras moleculares no encontradas en otros organismos, con diversas propiedades como: antibacterianos, anticancerígenos, antivirales, antitumorales, antiinflamatorios y anticoagulantes, entre otros (Blaine y Pyne, 1988; Schlegel, *et al.* 1999; Yuzuru, 2003; Ríos-Nurby *et al.*, 2009).

Los metabolitos secundarios que producen las algas se deben a una respuesta como defensa química contra los herbívoros, competencia por el espacio y nutrientes entre otras, estas moléculas bioactivas son liberadas en

su entorno, por lo que estos metabolitos secundarios constituyen una herramienta estratégica para su defensa en un medio tan competitivo (Ördög *et al.*, 2004).

Por otro lado, la marcada tendencia a desarrollar resistencia de las cepas bacterianas frente a los antibióticos comúnmente empleados, constituye un serio problema a escala mundial al aplicar tratamientos contra enfermedades infecciosas (Ramírez y Castaño, 2009). Una de las principales causas a dicha resistencia se debe al uso indiscriminado de medicamentos (antibióticos) generalmente empleados en el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos patógenos, sin mencionar los efectos secundarios indeseables de ciertos antibióticos. De modo que la aparición de infecciones anteriormente comunes, han dado lugar a investigaciones enfocadas en la búsqueda de nuevas sustancias antibióticas de diversas fuentes. (Hernández *et al.*, 2008).

Se calcula que un tercio de los medicamentos modernos tienen un origen natural o derivados de moléculas naturales (comprenden principalmente plantas superiores, microhongos y en menor proporción macroalgas), es aquí donde las microalgas tienen la oportunidad de desarrollarse ampliamente debido a que la diversidad biológica de los sistemas acuáticos incrementa la posibilidad de encontrar nuevos productos de interés farmacológico para el hombre, gracias al potencial que las microalgas ofrecen, por lo que se sugiere que estos microorganismos se convertirán en el foco de atención para dirigir los esfuerzos a la detección y selección de compuestos biológicamente activos (Pulz y Gross, 2004).



GENERALIDADES

IV. GENERALIDADES

Los extractos de las microalgas probadas en este trabajo pertenecen a los siguientes grupos:

4.1 Cianobacterias o algas verde azules

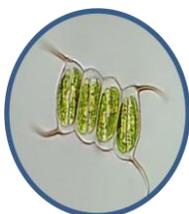


Spirulina subsalsa

Las cianobacterias o también llamadas algas verde-azules son procariontas, contienen clorofila a, β -carotenos, pero sus pigmentos distintivos son ficobilina-ficoeritrina y ficocianina. Algunas son capaces de fijar nitrógeno atmosférico dentro de células de pared muy gruesa llamadas heterocitos. Se reproducen asexualmente. Las unicélulas más pequeñas presentan formas esféricas o hemiesféricas. Algunas forman colonias globosas y otras tantas forman filamentos solitarios o en agregados (Lara *et al.*, 1996). El género *Spirulina* ejemplifica formas filamentosas, importante comercialmente con una producción anual estimada en más de 3.000 toneladas por año, se utiliza como aditivo para alimentos y piensos para los animales pescados, aves de granjas en todo el mundo, ya que es una rica fuente de antioxidantes, proteínas, minerales, vitaminas B12, ácidos grasos, β -caroteno y ácidos esenciales, tales como δ -linolénico (Gang-Guk *et al.*, 2008; Hutadilok-Towatana, *et al.*, 2010; Rodríguez y Triana, 2006).

4.2 Clorofitas o algas verdes

Las clorofitas o también llamadas algas verdes, son eucariontes, en ellas predomina la clorofila a, que le otorga su coloración verdosa, también contienen clorofila b, α β -carotenos y algunos otros pigmentos accesorios. Toleran amplios rangos de salinidad, por lo que se les puede encontrar en ambientes dulceacuícolas como marinos, presentan una gran variedad de cloroplastos al igual que tipos morfológicos.



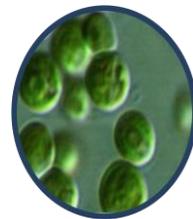
Scenedesmus quadricauda



Scenedesmus sp.

En esta división se comprenden la mayoría de las microalgas estudiadas en esta trabajo como son: *Scenedesmus dimorphus*, *Scenedesmus quadricauda*. Pertenecen a la familia *Scenedesmaceae*, caracterizada por presentar una organización morfológica tipo cenobial inmóvil, células de forma ovoidal dispuestas en cadena compuestas generalmente de 2, 4, 8 células, cloroplasto laminado con pirenoide, algunas células presentan extensiones de la pared celular que parecen espinas e inclusive mechones de cerdas finas que favorecen a la flotación.

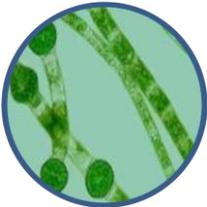
Dentro de la misma se comprende la familia *Chlorellaceae* que incluye *Chlorella miniata*, *C. kessleri*, *C. vulgaris*. Generalmente se presentan como células aisladas inmóviles con morfología esférica u ovoidal, cloroplasto en forma de copa, pirenoide no siempre presente.



Chlorella vulgaris

Y finalmente *Oedogonium* sp., clorofita conocida comúnmente como “lama” o “natas flotantes”. Pertenece a la familia *Oedogoniaceae* habita en cuerpos de

agua dulce, se caracteriza por formar filamentos simples, las células son largas y angostas, posee cloroplastos reticulados; presenta una forma de crecimiento basada en el desarrollo de masas flotantes que llegan a cubrir todo el cuerpo de agua. Esta alga sirve de alimento y protección a los renacuajos y a otros organismos acuáticos. En la medicina tradicional se ha usado esta alga para aliviar trastornos gastrointestinales (Vargas Solís, *et al*, 2011).



Oedogonium sp.

4.3 Bacterias: características principales

Las bacterias son organismos procariontas caracterizándose por la ausencia de núcleo, de forma que su material genético se encuentra inmerso en el citoplasma. Su tamaño oscila entre las 0.2 y 10 micra, representa el grupo de organismos más abundantes y de amplia distribución, pudiéndose encontrar

en todos los ambientes de nuestro planeta, incluso en las condiciones más extremas. Según su metabolismo se pueden clasificar en fotótrofas, quimiótrofas y autótrofas.

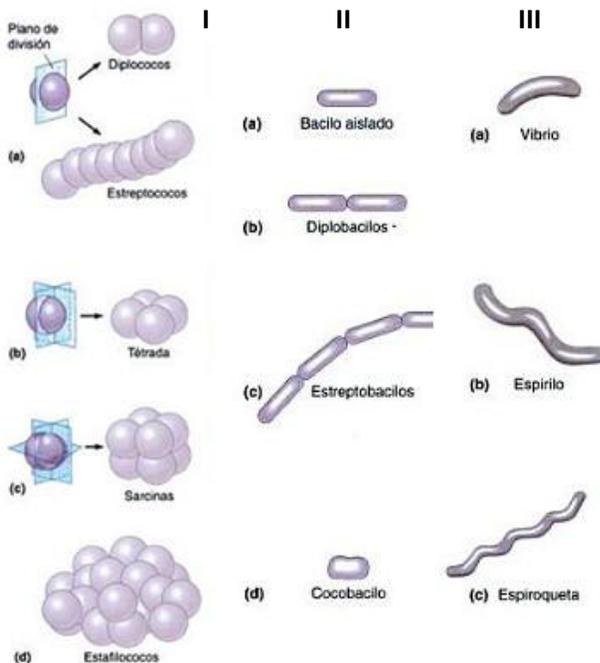


Figura 1. (I) Disposición de los **cocos**, **(a)** La división en un plano produce diplococos y estreptococos. **(b)** La división en dos planos produce tétradas. **(c)** La división en tres planos produce sarcinas. **(d)** La división en múltiples planos produce estafilococos.

(II) Bacilos **(a)** Bacilos aislados. **(b)** Diplobacilos. **(c)** Estreptobacilos. **(d)** Cocobacilo.

(III) Bacterias espirilares. **(a)** Vibrios. **(b)** Espirilos. **(c)** Espiroquetas. (J. Tortora *et al.*, 2007)

Presentan reproducción asexual y formas muy diversas, diferenciando cuatro grupos (por su forma): cocos, bacilos, espirilos y vibrios (Nieto, 2005).

Los cocos se caracterizan por ser redondeados, pueden presentarse aisladas o formando pequeñas colonias.

Según su agrupación espacial reciben el nombre de estreptococos si forman una cadena, diplococos si se unen de dos en dos y estafilococos si tienen forma de racimo. Los bacilos tienen forma de bastón, generalmente presentan flagelos que les proporcionan la capacidad de moverse, se pueden presentar aislados, en cadenas o en empalizada. Los espirilos presentan una estructura celular helicoidal y se mueven por la rotación de la hélice. Los vibrios tienen una forma curvada, se mueven mediante flagelos o por rápidas vibraciones (Nieto, 2005).

Las bacterias presentan una pared celular rígida formada por glucopéptidos y en algunos casos, tiene una cápsula externa responsable de la patogenicidad de las bacterias. De acuerdo a la estructura de la pared se pueden clasificar en gram positivas, distinguidas por presentar una pared bacteriana gruesa que consta de varias capas formada por peptidoglucano que rodea la membrana citoplasmática, algunos polisacáridos entre otros componentes y se tiñe cuando se someta a tinción Gram (Tortora *et al.*, 2007).

Bacteria	Características generales	Patología
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilo, aerobio facultativo.	Esta no es considerada patógena para el ser humano, sin embargo causa deterioro en los alimentos.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos, aerobios, anaerobios facultativos, en forma de cadenas, no forman esporas, ni fimbrias.	Produce procesos inflamatorios conjuntivitis, cistitis, entre otros.

Tabla 1. Descripción de las bacterias Gram positivas utilizadas en los bioensayos (Murray *et al.*, 2007).

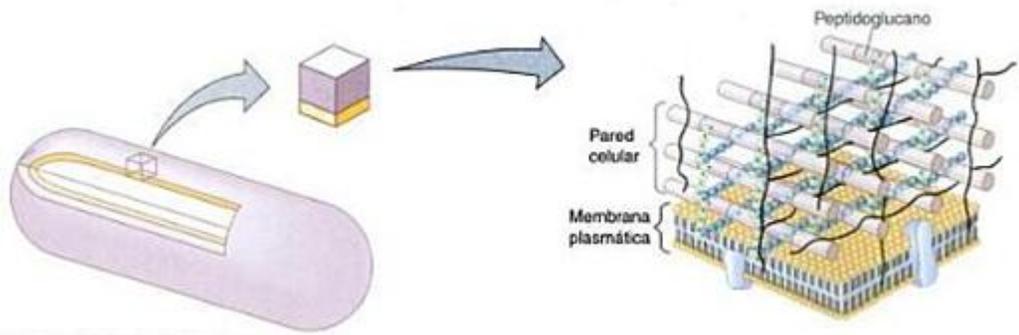


Figura 2. Pared celular de bacteria gram positiva (Tortora *et al.*, 2007)

En el caso de las gram negativas, son más complejas poseen dos capas situadas en el exterior de la membrana citoplasmática. Inmediatamente por fuera de la membrana citoplasmática se encuentra una delgada capa de peptidoglucano. En la parte externa de la capa de peptidoglucano se halla la membrana externa (bicapa lipídica) exclusiva de las bacterias gram negativas. Las bacterias no quedan teñidas por la tinción Gram (Tortora *et al.*, 2007).

Bacteria	Características generales	Patología
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Bacilos, móviles, aerobios, anaerobios facultativos,	Infección en vías urinarias y respiratorias, entre otras.
<i>Escherichia coli</i>	Bacilos, de 2 a 3 micras, aerobio, móvil con flagelos peritricos, con capsula, fimbria, no forman esporas	Infecciones en las vías urinarias, meningitis, enfermedad diarreica, entre otras.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilos móviles, aerobios, anaerobios facultativos, de 1.1 a 4.4 por 0.4 a 1.0 micras, flagelo polar único, fimbria, no forman cápsula ni esporas.	Gastroenteritis, diarrea, neumonía, infecciones urinarias y de heridas entre otras.
<i>Salmonella typhimurium</i>	Bacilos, aerobios, anaerobios facultativos, forman colonias de 2 a 4 mm, fimbrias, no encapsulados y no producen esporas.	Gastroenteritis aguda, fiebre tifoidea, entre otras.

Tabla 2. Descripción de las bacterias Gram negativas utilizadas en los bioensayos (Murray *et al.*, 2007).

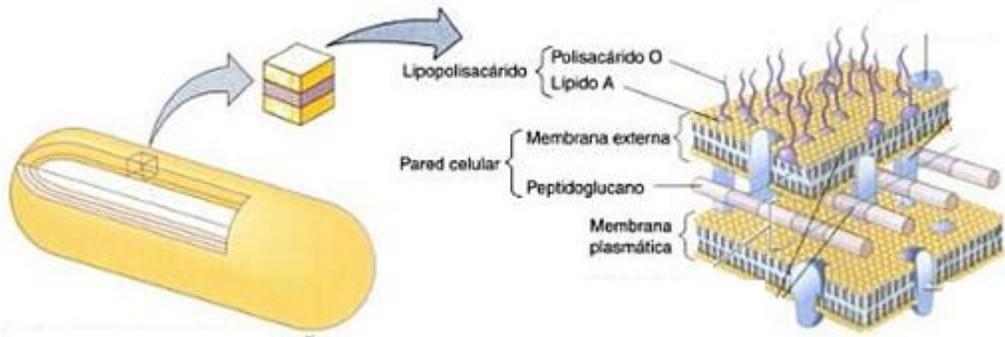


Figura 3. Pared celular de bacteria gram negativa (Tortora *et al.*, 2007)

Las bacterias cumplen un papel ecológico muy importante, ya que son los principales descomponedores de materia orgánica cerrando la cadena trófica. También son importantes en algunas asociaciones con vegetales, en la producción de antibióticos o de vitaminas. Por otra parte, son responsables de una gran cantidad de enfermedades.



ANTECEDENTES

V. ANTECEDENTES

Existen varios trabajos donde se reporta algún tipo de actividad biológica de una gran variedad de organismos albergados en sistemas acuáticos, en su mayoría marinos, tal como invertebrados (León *et al.*, 2010), poliquetos (Hernández *et al.*, 2008), macroalgas, (Castro Reyes, 1997; De Lara-Isasi, *et al.*, 1999; Magallanes *et al.*, 2003) producción de toxinas por cianobacterias y dinoflagelados, solo por mencionar algunos. Haciendo mención a este último, en el año de 1973 se determinó aphatoxina una toxina de *Aphanizomenon flos-aquae*, una mezcla de varios compuestos, una de las toxinas involucradas es la saxitoxina, comúnmente asociada con dinoflagelados por las floraciones tóxicas que llegan a producir, sin embargo se reporta como un apoyo en determinados procedimientos de microcirugía y como un tratamiento experimental para la miopía, al actuar como un anestésico (Pulz y Gross, 2004).

Si nos referimos a estudios enfocados en la detección de actividad antibiótica particularmente en microalgas, se tienen datos que indican que desde 1930 y 1940 se demostró la producción de diversas sustancias biológicamente activas de algunas microalgas (Ördög *et al.*, 2004), algunas de ellas han sido identificadas, tal es el caso de la “chlorelina” de ácidos grasos identificado como el principal activo antibacteriano en *Chlorella vulgaris*.

Por su parte Blane y Pyne quienes en 1988 publican “Biologically active compounds from microalgae” donde señalan el uso de *Nostoc* para el tratar la gota y el cáncer, situación que los estimuló a sugerir y luego demostrar la

producción de sustancias antibióticas y autotóxicas a partir de microalgas y para el mismo año se notificó que el componentes de *Lyngbya majuscula* y nueve cianobacterias del genero *Oscillatoria* tuvieron actividad específica contra una leucemia en ratones.

Por otro lado Ördög y colaboradores reporta en el 2004 la actividad inhibitoria de diez extractos metanólicos correspondientes a tres géneros (*Desmococcus*, *Chlorella* y *Scenedesmus*) de clorofitas, probados contra diferentes cepas bacterianas Gram + y Gram -, mostrando altos niveles de actividad en casi todas las microalgas. En el mismo año Chu *et al.* reportan la actividad antibiótica de dos especies de *Chlorella* usando como agente extractor etanol y acetona, extractos probados ante bacterias patógenas, resultando halos de inhibición de 2.4mm de Ø.

En el 2008 Abedin y Taha reportan actividad antibacteriana y antifúngica en extractos acetónicos y metanólicos de dos clorofitas y dos cianobacterias, mismo año en que Kaushik y Abhishek Chauhan reportaran sensibilidad antibiótica en cuatro diferentes bacterias patógenas mediante un extracto metanólico de *Spirullina platensis*. Para el 2010 Naranjo-Briceño *et al.* quienes utilizaran la misma especie logrando identificar el ácido piperólico vía α -aminoadipato- β -semialdehído, el cual favorece el metabolismo del aminoácido lisina, además de ser un precursor importante de numerosos metabolitos secundarios: antibióticos, vitaminas, aminoácidos, enzimas, agentes antitumorales en microorganismos y plantas.

Y si ahora nos referimos a estudios realizados en función de la detección de actividad antibiótica en microalgas de México, nos daremos cuenta que han sido poco estudiadas. Dentro de los trabajos existentes podemos mencionar a Martínez Flores quien en 2007 reporta la presencia de actividad

antibacteriana en *Microcoleus lacustris* y *Blennothrix ganeshi* en diferentes concentraciones de extracto (cloroformo, metanol, agua y hexano) probado sobre cuatro cepas bacterianas de colección, logrando aislar e identificar por medios espectroscópicos el principio activo del extracto hexánico de *Microcoleus lacustris*, identificado como 3 α acetil-12-hidroxiabieta - 5(10), 6, 8, 11, 13, pentano. En el mismo año Pérez Gutiérrez evaluó la actividad antimicrobiana de extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de *Oedogonium capillare* probados ante ocho diferentes bacterias, donde se observó un amplio espectro antibacteriano en el extracto hexánico en comparación de los otros dos. Clorofita estudiada también por varios autores (Negrete Redondo *et al.*, 2006; López Duran, 2007; López Simeón *et al.*, 2007).

HIPOTESIS

VI. HIPOTESIS

Se ha observado que muchos microorganismos son capaces de producir sustancias con actividad biológica, como los antibióticos, tal es el caso de las microalgas. También se ha notado que algunas condiciones ecológicas como la competencia, la herbivoría y la densidad, entre otras pueden favorecer la producción de este tipo de metabolitos.

Si estas observaciones se aplican a las especies con las que estamos trabajando, los cultivos de microalgas analizadas en una fase de crecimiento estresante tendrán una mayor probabilidad de producir una sustancia antibiótica.



OBJETIVOS

VII. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Detectar actividad antibiótica en extractos de *Scenedesmus dimorphus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella miniata*, *Chlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella capsulata*, *Spirulina subsalsa* y *Oedogonium* sp. en condiciones de laboratorio.

Establecer cultivos de las clorofitas dulceacuícolas *Scenedesmus dimorphus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella miniata*, *Chlorella kessleri* y *Chlorella vulgaris*, de la cianobacteria *Spirulina subsalsa* y *Chlorella capsulata* de origen marino con la finalidad de llevar acabo bioensayos, para detectar actividad antibiótica.

7.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar antibiogramas contra bacterias Gram + y Gram – modelo.
- Establecer cultivos de *Scenedesmus dimorphus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella miniata*, *Chlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella capsulata* y *Spirulina subsalsa* en 16 L de producción.
- Determinar la tasa de crecimiento de *Scenedesmus dimorphus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella miniata*, *Chlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella capsulata* y *Spirulina subsalsa*

- Cosecha de la biomasa algal para la obtención de extractos crudos en fase de crecimiento exponencial y en fase estacionaria.

MATERIAL Y METODO

VIII. MATERIAL Y METODO

8.1 ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS

Los cultivos se iniciaron con cepas de *C. miniata*, *C.vulgaris.*, *C.kessleri*, *S. dimorphus*, *S. obliquus* *S. quadricauda* de agua dulce y *S. subsalsa* y *Chlorella capsulata* especies marinas, provenientes del cepario de la UAM – I

Tabla 3. El volumen inicial fue de 100ml, posteriormente se escaló a 500ml, 3L y 16L. Cada cultivo se estableció por triplicado.

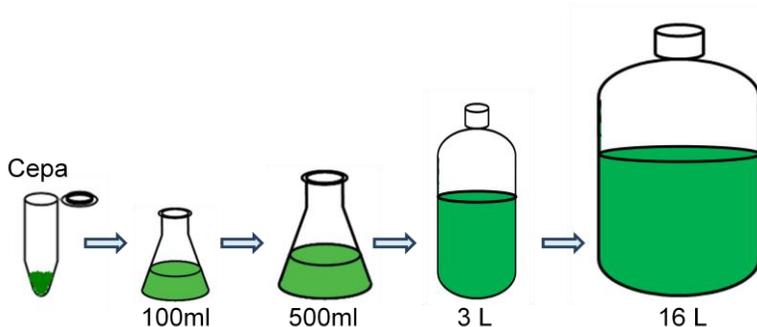


Figura 4. Escalado y volúmenes de cultivo.

Para el caso de *Oedogonium* sp. la muestra se recolectó mediante una red, del lago artificial ubicado en la Universidad Iberoamericana campus Puebla, seleccionando los ejemplares más vigorosos. Una vez colectada el alga, se lavó con agua limpia, se eliminó toda la materia extraña con unas pinzas de

punta fina y se garantizó la limpieza del material observando a través de un microscopio estereoscópico.

Microalga	Localidad de colecta
<i>Spirulina subsalsa</i>	Tamaulipas, Tampico
<i>Chlorella capsulata</i>	UTEX collection
<i>Chlorella miniata</i>	Lago de Catemaco, Veracruz
<i>Chlorella vulgaris</i>	Lago de Chalchoapan, Veracruz
<i>Chlorella kessleri</i>	Baja California Sur, La Paz
<i>Oedogonium</i> sp.	Puebla, Puebla
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	Puebla, Puebla
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Hidalgo, Pachuca
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Hidalgo, Pachuca

Tabla 3. Localidad donde se colectaron y aislaron las microalgas utilizadas en los bioensayos.

Las curvas de crecimiento se obtuvieron mediante conteo celular. Se tomó una muestra diaria de 1ml la cual se fijó con acetato de lugol. El conteo celular se realizó con la ayuda de un microscopio óptico Zeiss y una cámara Newbauer.

Para calcular la concentración celular (células/ml) se utilizó la siguiente fórmula:

$$C = N * 10^4 * Dil$$

En donde:

C = células/ml

N = promedio de las células presentes en 1mm² (0.1 µl)

Dil = factor de dilución

Con los datos de concentración celular de cada recuento se obtiene la curva de crecimiento (Arredondo y Voltolina, 2007).

8.2 ESTERILIZACIÓN QUÍMICA

Para los cultivos a partir de 3L se utilizó agua suave, la cual se esterilizó químicamente para eliminar bacterias, adicionando hipoclorito de sodio en una relación de 3ml/L, se dejó actuar por 24 hrs, pasado el tiempo se mantuvo con aireación por 24 hrs. En algunos casos se adicionó tiosulfato de sodio 2.85gr/8 L de agua. Para los volúmenes más pequeños se utilizó agua destilada, esterilizada en autoclave.

8.3 MEDIO DE CULTIVO

El medio que se utilizó para *C. miniata*, *C. vulgaris.*, *C.kessleri*, *S. dimorphus*, *S. obliquus* *S. quadricauda* fue un fertilizante foliar (Bayfolan forte[®]) en una proporción de 1ml por litro de cultivo, el cual se vertió al sistema correspondiente una vez esterilizada el agua, dejando pasar 5 minutos antes de inocular el sistema en turno, para permitir que el medio se homogenizara.

Para *Spirulina subsalsa* se requirió cloruro de sodio 30gr/L, bicarbonato de sodio 8gr/L y fertilizante foliar (Bayfolan forte[®]) en la razón antes mencionada, para el medio de *Chlorella capsulata* fueron las mismas a excepción del bicarbonato.

8.4 PARÁMETROS DE LOS CULTIVOS

Los cultivos de 300 y 500ml se mantuvieron en una cámara de cultivo bajo las siguientes condiciones, ciclo de luz oscuridad 12:12 h, a 22°C y $166.8\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradianza. Los cultivos a partir de 3L se mantuvieron con aireación constante, ciclo de luz: oscuridad de 12:12 h y a una temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$).

8.5 COSECHA

Una vez obtenidas las curvas de crecimiento de los cultivos, nos permitió determinar los tiempos de cosecha, teniendo particular interés en las fases de crecimiento exponencial y estacionaria. Se tomaron 16L de cada sistema de cultivo para la obtención de la biomasa algal, la cual fue concentrada con la ayuda de una centrifuga y lienzos (200T), la biomasa resultante se almacenó en tubos tipo Falcon previamente rotulados. La biomasa se liofilizó y se preservó en refrigeración hasta su análisis.

8.6 PRUEBAS DE ANTIBIOSIS

8.6.1 CULTIVO DE BACTERIAS

El cultivo de las bacterias Gram + (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*) y Gram – (*Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*

aeruginosa y *Salmonella thyphimurium*) se inició con una muestra de las cepas stock. Para la preparación del medio se adicionó 0.8gr caldo nutritivo y 0.4gr base de agar sangre a 100 ml de agua destilada, así se prepararon seis matraces, mismos que pasaron por la autoclave durante 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión, posteriormente se tomaron aproximadamente 5ml de cada una de las bacterias antes mencionadas vertiéndolas en cada matraz previamente rotulado y finalmente se mantuvieron en la cámara de cultivo a 36°C por 2 días pasado este tiempo se conservaron en refrigeración hasta su uso.

8.6.2 EXTRACTO DE LA BIOMASA ALGAL

Para la obtención de los extractos se requirió de biomasa (previa liofilización de la biomasa) de cada unas de las microalgas enlistadas en la **Tabla 1**. La extracción se realizó mediante dos técnicas. En la primera (A) (**Figura 5**) se utilizaron 3gr de biomasa a la cual se adicionó una mezcla de butanol metanol y agua 5:20:75, se dejó 48 horas en refrigeración, y posteriormente se secaron a temperatura ambiente; por último se resuspendió la pasta algal con 10ml de solución salina 0.9% y se conservó en refrigeración hasta su uso. En la segunda (B) (**Figura6**) se utilizó 1gr de biomasa pero en este caso se obtuvieron dos fracciones liposoluble e hidrosoluble, mediante agua y metanol al 99.8% respectivamente, en una proporción 1:50 (p/v).

Para la fracción hidrosoluble se sometió a un proceso de congelado-descongelado por 5 ocasiones, para asegurar la ruptura celular. Para el extracto metanólico se dejó reposar 48 horas en refrigeración a una temperatura de 4°C, posteriormente ambos se centrifugaron a 5000 rpm por

20 min, se recuperó el sobrenadante, se evaporaron a temperatura ambiente, se resuspendió con 10ml de agua u metanol según la fracción y se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

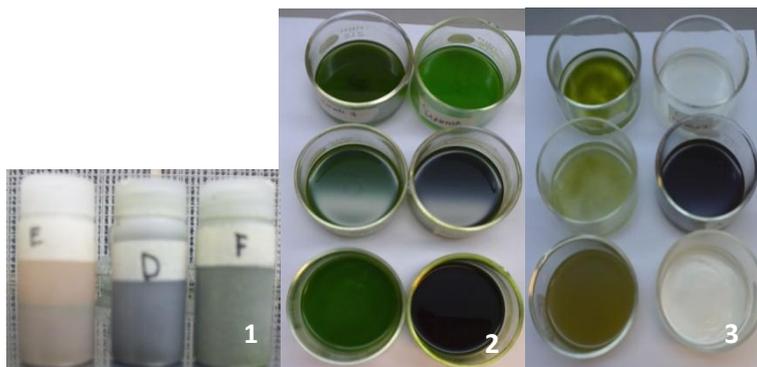


Figura 7. Extractos derivados del método (A), (1) y (B), liposolubles (2) e hidrosolubles (3).

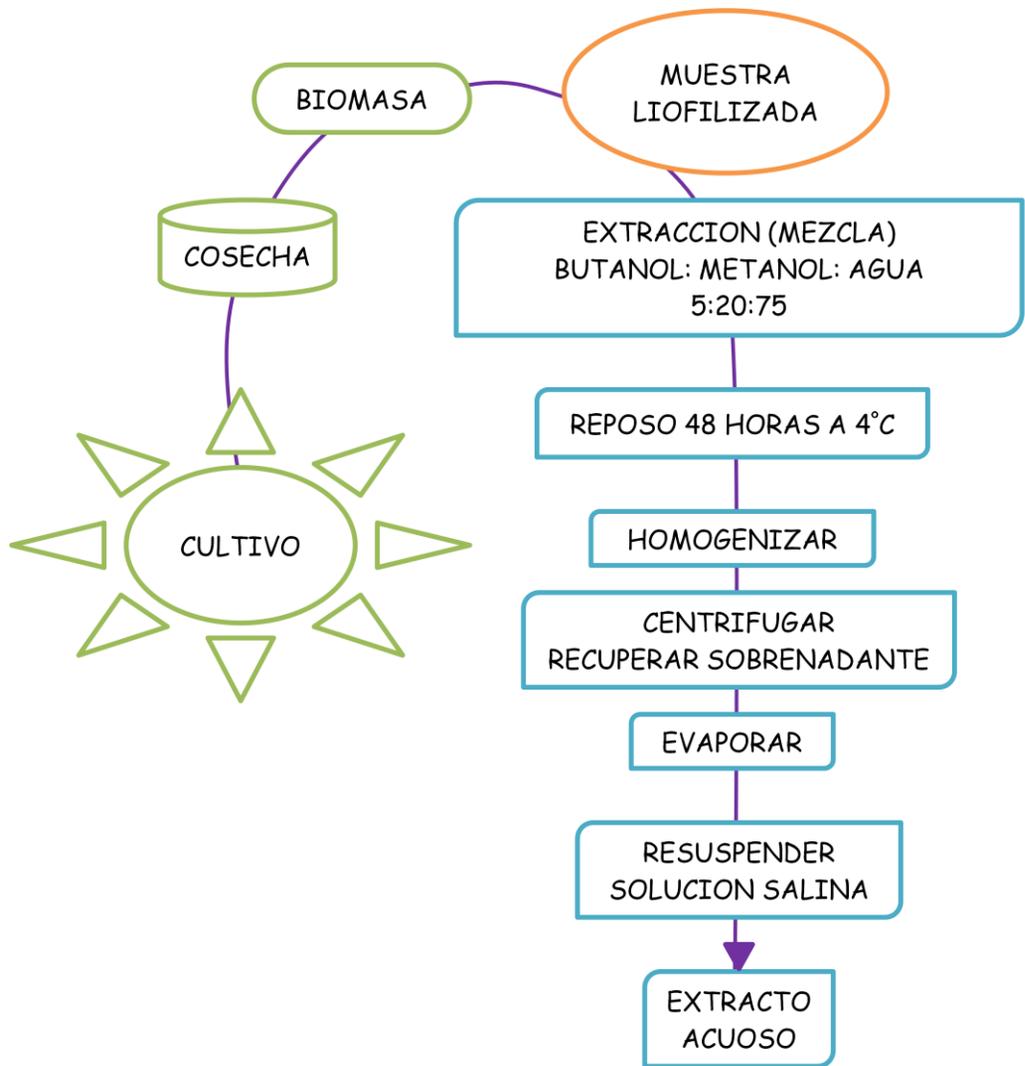


Figura 5. Protocolo de extracción (A) para los bioensayos.

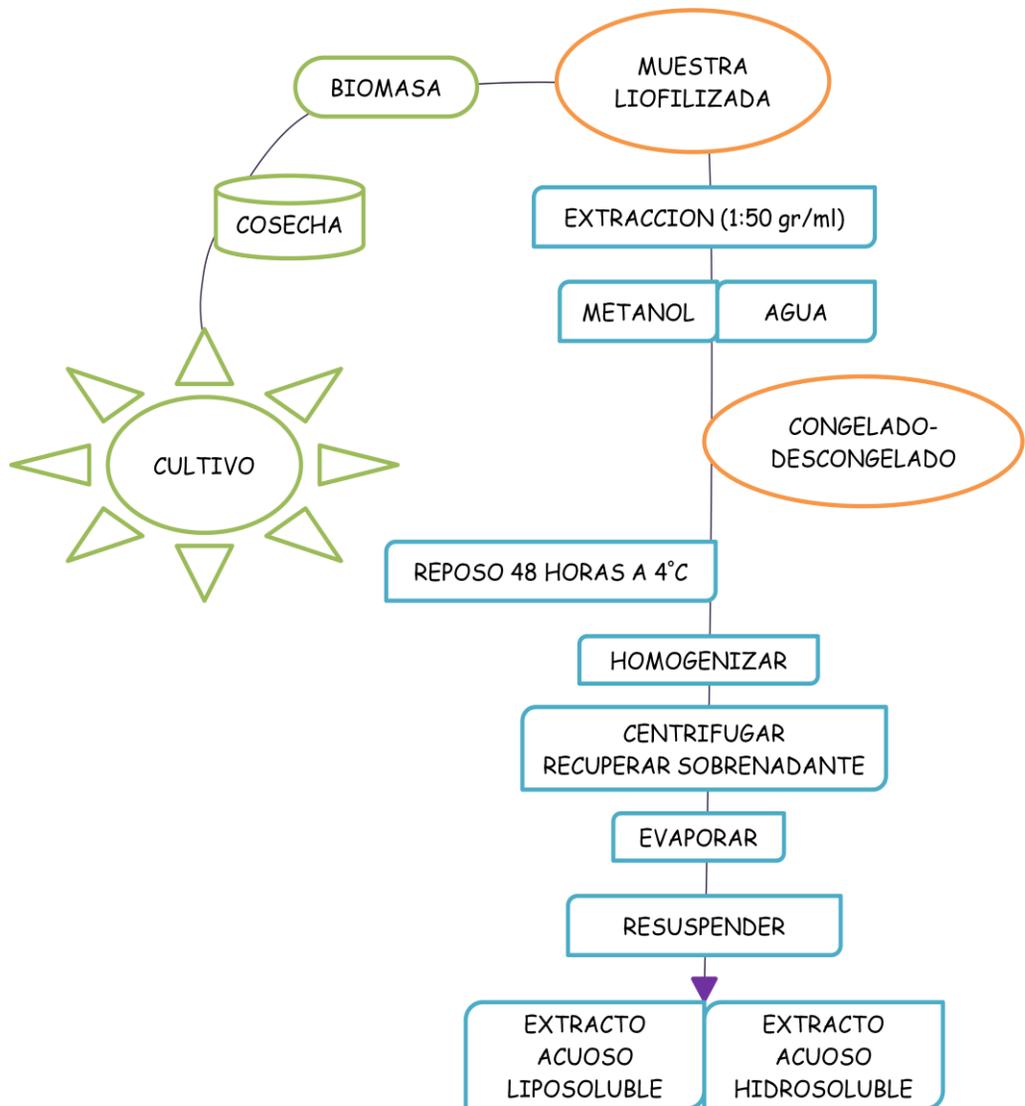


Figura 6. Protocolo de extracción (B) para los bioensayos.

8.6.3 PREPARACIÓN DE DISCOS

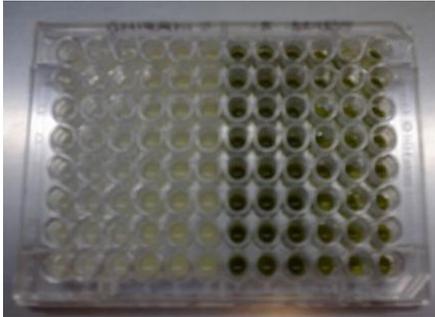


Figura 7. Placa con filtros cargados con extracto acuoso y metanólico de *Scenedesmus obliquus*.

Una vez resuspendido el extracto y colocados los discos de papel Whatman No. 42 en placas de poliestireno (provistas de 96 pozos), se procedió a verter el extracto correspondiente de acuerdo a la concentración y microalga en turno **Tabla 4** con ayuda de una micropipeta, dichas placas se mantuvieron en una cámara hermética de luz UV durante 2 días.

Microalga	Concentraciones			
<i>Spirulina subsalsa</i>	Extracto (A)			
<i>Chlorella capsulata</i>	[1]	[2]	[3]	Control
<i>Chlorella kessleri</i>	1	2	4	1
<i>Chlorella miniata</i>				
<i>Chlorella vulgaris</i>				
<i>Oedogonium sp.</i>				
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	Extracto (B)			
<i>Scenedesmus obliquus</i>	[1]	[2]		Control
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	50µl	100µl		50µl

Tabla 4. Microalgas sometidas a dos métodos de extracción, (A) mezcla de: butanol, metanol y agua, 5:20:75 y (B) agua y metanol.

8.6.4 ANTIBIOGRAMAS

Los antibiogramas se realizaron con el procedimiento de difusión de placa descrito por Kirby-Bauer. El protocolo que se siguió se esquematiza en la **Figura 8**. Se preparó medio de cultivo de acuerdo a la siguiente relación 40gr/L agar bacteriológico, 18gr/L base de agar en sangre y agua destilada, se mantuvo en autoclave por 15 min a 15 libras de presión, posteriormente fue inoculado con una de las seis bacterias utilizadas, se vertió 30ml en cada una de las cajas petri estériles previamente rotuladas. Una vez solidificado el agar se prosiguió a colocar los filtros, previamente cargados de extracto, de acuerdo a las concentraciones manejadas, ver

Tabla 4. Las cajas se incubaron a 37°C y se examinaron pasadas las 24, 36 y 48 horas. Se midió cada halo de inhibición empleando un vernier. Los valores obtenidos se promediaron, obteniendo así el diámetro promedio utilizado como índice de actividad antibacteriana. Las pruebas se realizaron por triplicado.

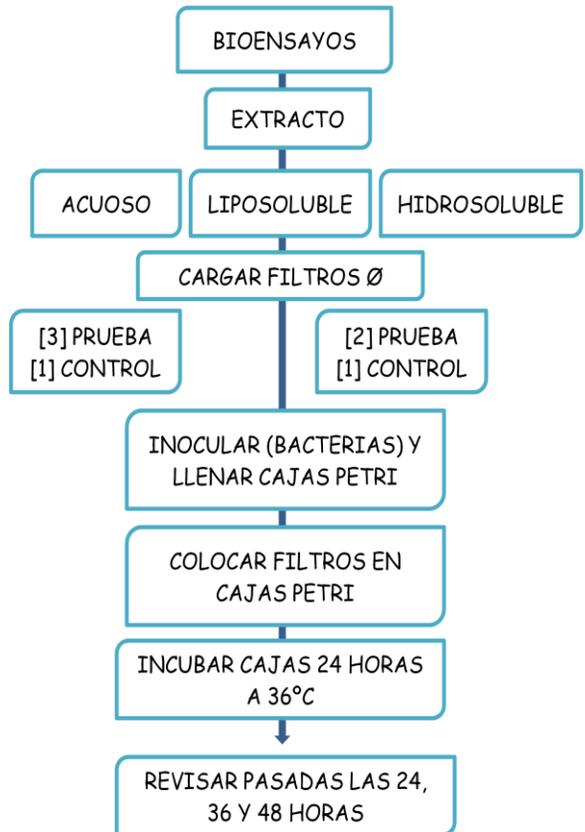


Figura 8. Protocolo para los bioensayos.



RESULTADOS

IX. RESULTADOS

9.1 TASA DE CRECIMIENTO

Se determinó la tasa de crecimiento de las dos fases de crecimiento de interés, fase exponencial y estacionaria, por consecuencia el tiempo de cosecha **Tabla 5**, se puede observar la cantidad de células existentes al tiempo de la cosecha de los cultivos para la obtención de la biomasa en dichas fases. Reportando en fase estacionaria una mayor probabilidad de producción de metabolitos secundarios (B, Jaki *et al.*, 1999; P. Mian *et al.*, 2003).

Microalga	Fase Exponencial	Fase Estacionaria
<i>Spirulina subsalsa</i>	427,222 mil	839,500 mil
<i>Chlorella capsulata</i>	984,318 mil	2,743,333 millones
<i>Chlorella kessleri</i>	996,358 mil	2,985,433 millones
<i>Chlorella miniata</i>	874,291 mil	1,879,533 millón
<i>Chlorella vulgaris</i>	921,196 mil	2,469,533 millones
<i>Oedogonium</i> sp.		300 gr. *
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	2,074,667 millones	5,960,000 millones
<i>Scenedesmus obliquus</i>	2,296,521 millones	2,983,167 millones
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	593,888 mil	1,386,388 millón

Tabla 5. Numero células de las microalgas al tiempo de su cosecha, en fase de crecimiento exponencial y fase estacionario. * Peso húmedo.

9.2 BIOENSAYOS

Con la intención de contribuir en la búsqueda de compuestos con actividad antibacteriana a partir de fuentes naturales, se probaron los extractos de las

siguientes microalgas *Chlorella miniata*, *Chlorella vulgaris*., *Chlorella kessleri*, *Oedogonium* sp., *Scenedesmus dimorphus*, *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus quadricauda* y dos especie marinas *Chlorella capsulata* y *Spirulina subsalsa* con el propósito de inhibir seis diferentes bacterias patógenas Gram + (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*) y Gram – (*Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella thyphimurium*).

Se probó un total de 54 extractos, 18 obtenidos por el método (A) y 36 por el (B). Los extractos del método A y B (Metanol) (**Figura 9; Tabla 6**) muestran ausencia de actividad antibacteriana en ambas fases de crecimiento ante las seis cepas de bacterias utilizadas.

Tablas 6. Actividad antibiótica, utilizando extractos del método A y B (Metanol) de 9 microalgas en dos fases de crecimiento probados contra 6 bacterias patógenas.

Microalga	Gram +			Gram -		
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. Coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. thyphimurium</i>
Cianofita						
<i>Spirulina subsalsa</i>	-	-	-	-	-	-
Clorofitas dulceacuicolas						
<i>Chlorella miniata</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Chlorella kessleri</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Oedogonium</i> sp.	-	-	-	-	-	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Scenedesmus obliquus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	-	-	-	-	-	-
Clorofita marina						
<i>Chlorella capsulata</i>	-	-	-	-	-	-

La actividad antibiótica fue probada con las siguientes bacterias Gram + (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*) y Gram – (*Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella thyphimurium*). El símbolo – indica la ausencia de actividad

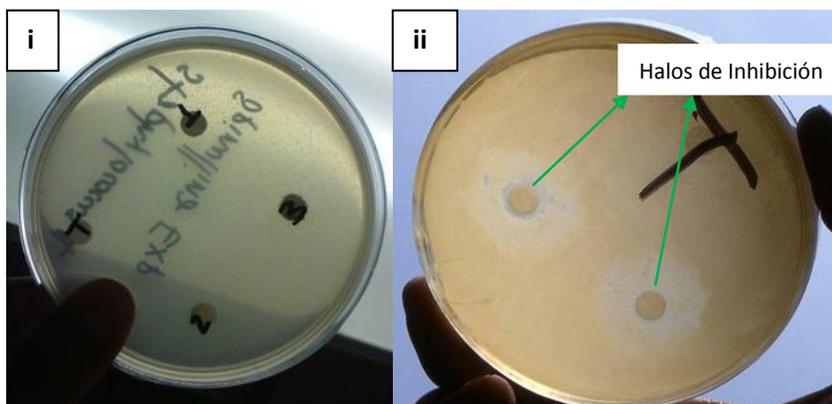


Figura 9. La actividad antibiótica fue determinada por la técnica de difusión de placa. (i) Los extractos (método A) de las 8 cepas de microalgas no presentaron actividad contra las bacterias utilizadas, (ii) Ejemplificación de halos observados en *S. aureus* utilizando extracto de macroalgas marinas.

Tablas 7. Actividad antibiótica, utilizando extractos del método B (Agua) de 9 microalgas en dos fases de crecimiento probados contra 6 bacterias patógenas.

Microalga	Gram +			Gram -		
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. Coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. thyphimurium</i>
Cianobacteria						
<i>Spirulina subsalsa</i>	-	-	-	-	-	-
Clorofitas dulceacuicolas						
<i>Chlorella miniata</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Chlorella kessleri</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Oedogonium sp.</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Scenedesmus obliquus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	-	-	-	-	*	-
Clorofita marina						
<i>Chlorella capsulata</i>	-	-	-	-	-	-

La actividad antibiótica fue probada con las siguientes bacterias Gram + (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*) y Gram – (*Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella thyphimurium*). El símbolo * indica presencia de actividad y – indica la ausencia de actividad

Sin embargo a pesar de estos resultados obtenidos se han reportado algunos trabajos en los cuales se menciona actividad antibiótica en algunas de las microalgas utilizadas, tal es el caso de *C. kessleri*, aislada de un cuerpo de agua en Taiwan presentó una zona de inhibición de 8 – 15 mm de diámetro ante *Escherichia coli*, *P.aeruginosa*, *S. aureus*, publicada por C.Y. Chu; *et al.*, 2004 donde se utilizó como agente extractor etanol y acetona. En el 2007 Saracco-Álvarez documenta el uso del cultivo de *Chlorella* sp. como reductor de la abundancia de *Vibrio cholerae* en estanques para el tratamiento de aguas en Marruecos y cultivos de camarón.

Para *Oedogonium* sp. se tienen los siguientes estudios, en los que se determinó el efecto antiespasmódico empleando diferentes extractos metanólico, hexánico y clorofórmico sobre un bioensayo realizado en íleon aislado de rata Wistar (Vargas Solís, *et al*, 2011), también se probó el extracto de *Oedogonium capillare* el cual inhibió 23 bacterias tanto patógenas de humanos como ictiopatógenas (en peces *Carassius auratus*), pertenecientes a las familias pseudomonadaceae, aeromonadaceae, enterobacteriaceae y vibronaceae (Negrete Redondo, *et al*, 2006), entre otros.

En los extractos derivados del método (B), a los cuales se añadió agua destilada, solo una especie (*Scenedesmus quadricauda*) presentó actividad biológica ante *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, bacteria gram negativa que exhibió sensibilidad ante el extracto acuoso de *S. quadricauda* **Figura 10**. El diámetro promedio de los halos de inhibición fue de 4 y 5 milímetros para la concentración 1 y 2 respectivamente, Tabla 8. Los resultados fueron corroborados.

La actividad biológica observada fue menos potente que la esperada, al observar un efecto bacteriostático, el cual a diferencia de la actividad

antibiótica no produce la muerte a las bacterias, sin embargo inhibe o retarda el crecimiento bacteriano. (Comunicación personal).

Concentración	[1]	[2]
Diámetros obtenidos (mm)	4	5
	3	5
	4	4
Promedio	4	5

Tabla 8. Diámetro promedio (mm) de halo de inhibición del extracto acuoso de *Scenedesmus quadricauda* cultivada en un volumen de 16 L cosechada en fase estacionaria frente a la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

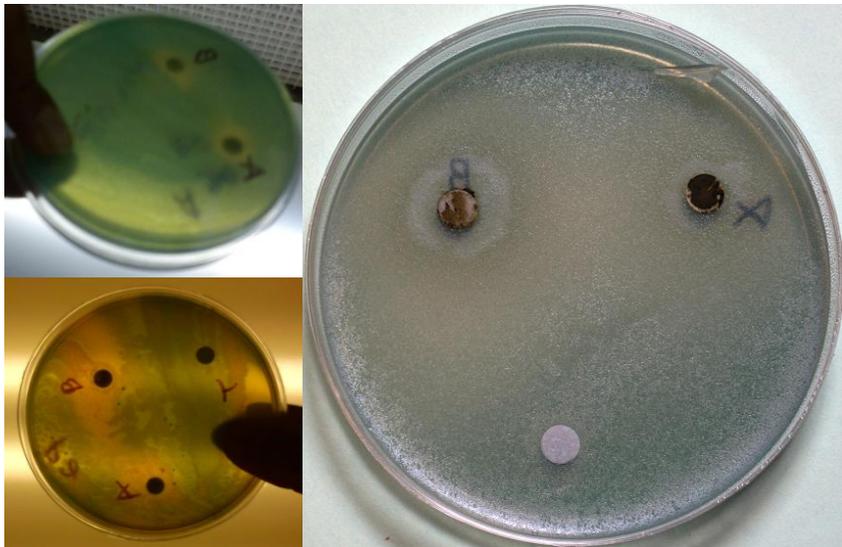


Figura 10. Actividad bacteriostática determinada mediante la técnica de difusión de placa. El extracto acuoso de *Scenedesmus quadricauda* inhibió el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. El diámetro del halo de inhibición promedio fue de 4 mm para la concentración A y 5 mm para la B.

DISCUSSION

X. DISCUSION

En la literatura se manifiestan diversas opiniones al considerar la resistencia o sensibilidad a una cepa bacteriana cuando se llevan a cabo pruebas antimicrobianas con extractos derivados de microalgas. Escritos como el de Chu; *et al.*, 2004 no expone un diámetro mínimo para delimitar entre la resistencia o sensibilidad, sin embargo el diámetro mínimo reportado es de 8 mm, el cual reporta positivos para actividad antibiótica en varios extractos. Por su parte Ördög *et al.*, 2004 presentan 5 mm como diámetro mínimo considerado como sensible ante cepas bacterianas. En el 2003 Mian y colaboradores reportan como diámetro mínimo 2 mm y como máximo más de 5 mm, valores que reportan actividad antibacteriana.

Algunos otros trabajos utilizan como referencia para considerar el efecto antimicrobiano como positivo ≥ 2 mm de diámetro promedio, tal es el caso de Jaki, *et al.*, 1999; Mian, *et al.*, 2003; Rosales, 2007.

Algal Specie	Organic solvents	Bacterial species			
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>Scenedesmus</i>	Ethanol	R	4.0	1.0	R
<i>quadricauda</i>	Acetone	R	3.0	1.5	R
	Diethyl ether	R	2.5	R	R
	methanol	1.5	2.0	1.2	R

Figura 11. Actividad antibiótica reportada por Abedin y Taha Hala, 2008.

De manera que bajo estas consideraciones de positivo para actividad antibiótica, se puede inferir que existe actividad bacteriostática en el extracto acuoso (obtenido por el método de extracción B) de *Scenedesmus quadricauda* cosechada en fase estacionaria contra la cepa bacteriana gram negativa *Pseudomonas aeruginosa*

ATCC 27853.

Con respecto a la actividad antibiótica de *Scenedesmus quadricauda* Abedin y Taha Hala reportan para el 2008 actividad en cuatro extractos **Figura 11** probados contra cuatro bacterias, mismas utilizadas en este estudio. Uno de los agentes extractores fue metanol, el cual inhibió tres de las cuatro bacterias probadas (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*) a excepción de *Pseudomonas aeruginosa* la cual no presentó sensibilidad ante alguno de los extractos probados.

A diferencia de los resultados obtenidos por Abedin y Taha en el 2008, en el presente trabajo no se encontró actividad antibiótica en el extracto metanólico probado contra las mismas bacterias, sin embargo en este trabajo se observó sensibilidad en la cepa bacteriana *Pseudomonas aeruginosa*, única bacteria que no presentó sensibilidad en alguno de los extractos probados por Abedin y Taha, 2008.

Si consideramos que la cepa de *Scenedesmus quadricauda* probada por Abedin y Taha, 2008 fue colectada en Egipto y la cepa de este trabajo fue aislada de la presa Vicente Aguirre localizada en el estado de Hidalgo, a pesar de tratarse de la misma especie de microalga podemos suponer que la producción de metabolitos secundarios varía según las condiciones del medio ambiente.

Por su parte Ördög *et al.*, 2004 reporta igualmente actividad antibiótica en dos géneros de *Scenedesmus* sp. ante *S. aureus* y *Alternaria* sp. con halos que van de 5 a 10 mm respectivamente, así como en seis especies de *Chlorella*.

Por otro lado, se ha reportado en muchos microorganismos la producción de sustancias con actividad biológica (Castro Reyes, 1997; De Lara-Isasi, *et al.*; 1999, Magallanes *et al.*, 2003; Ördög *et al.*, 2004; Pulz y Gross, 2004; Torres-Ariño, 2004; Hernández *et al.*, 2008; León *et al.*, 2010;) de igual forma se ha informado que algunas condiciones ecológicas como la competencia, la

herbivoría y la densidad, entre otras pueden favorecer la producción de metabolitos (Benkendorff, *et al.*, 2001; Ördög *et al.*, 2004; Chadwick, *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2008) de manera que en situaciones de estrés es cuando suele presentarse una mayor producción de estos metabolitos los cuales son liberados a su entorno, constituyendo una herramienta estratégica para su defensa en un medio tan competido (Ördög *et al.*, 2004). Por lo que podemos decir que la hipótesis plantea es aceptada al encontrar actividad biológica en el extracto acuoso de *Scenedesmus quadricauda*, biomasa cosechada en fase estacionaria, encontrando a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sensible a dicho extracto.

Para *Spirulina subsalsa*, *Chlorella miniata*, *Scenedesmus dimorphus*, *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella capsulata* no se han reportado trabajos similares.

CONCLUSION

XI. CONCLUSION

En esta investigación se probó un total de 54 extractos, 18 obtenidos por el método (A) y 36 por el (B). Los extractos del método A y B (Metanol) (**Figura 9; Tabla 6**) muestran ausencia de actividad antibiótica en ambas fases de crecimiento ante las seis cepas de bacterias utilizadas, por otro lado los derivados del método B (agua), de estos se encontró actividad biológica en el sobrenadante acuoso de *Scenedesmus quadricauda* cosechada en fase estacionaria ante una cepa bacteriana gram negativa, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 siendo está sensible ante el extracto acuoso, exhibiendo un halo promedio de 4 y 5 mm para la concentración 1 y 2 respectivamente **Tabla 8, Figura 10**. El resultado obtenido es de gran relevancia ya que en general los antibióticos son menos eficaces tratándose de bacterias gram negativas, ello debido a su compleja estructura en la pared celular lo cual complica la penetración del compuesto activo.

Un punto importante que probablemente favoreció al resultado positivo obtenido, se deba a la modificación de la técnica de extracción, ya que el proceso repetido de congelado – descongelado, pudo favorecer a la liberación de los metabolitos presentes en *Scenedesmus quadricauda* al ser esta una especie que posee una pared celular rígida formada por 3 capas (Bisalputra y Weie, 1963).

Aunque existen otros factores como la variación estacional, la variación geográfica, factores físicos y ambientales entre otras que pueden influir de manera importante en la ausencia, presencia e intensidad de la actividad de

los metabolitos (De Lara-Isasi, *et al*, 1999) (Vidyavathi & Sridhar, 1991) responsables del poder bactericida de las algas.



BIBLIOGRAFIA

XII. BIBLIOGRAFIA

- Abalde J, Cid A, Fidalgo JP, Torres E y Herrero C. (1995). *Microalgas: cultivo y aplicaciones*. La Coruña, Servicio de Publicaciones. 210 pp.
- Abedin M. A. Rania and M. Taha Hala. (2008). Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae. Evaluation of medium components by Plackett-Burman design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry* 3(1): 22-31 pp.
- Arredondo Vega Berta O. y Dominico Voltolina. (2007). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. La Paz, Baja California Sur México, CIBNOR, S.C. 97 pp.
- B. Jaki, J. Orjala, H-R Bürgi and O. Sticher. (1999). Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharmaceutical Biology*. 37(2): 138-143 pp.
- Benkendorff Kirsten, Davis Andrew R and Bremner John B. (2001). Chemical defense in the egg masses of benthic invertebrates: an assessment of antibacterial activity in 39 mollusks and 4 polychaetes. *Journal of invertebrate pathology*. 78(2): 109-118 pp.
- Bisalputra T. and Weier T. E. (1963). The Cell Wall of *Scenedesmus quadricauda*. *American Journal of Botany*. 50 (10): 1011-1019 pp.
- Blaine Metting and John W. Pyne. (1988). Biological active compound from microalgae. *Enzyme Microb. Technol.* 8:386-394.
- Castro Reyes Marco Antonio. (1997). *Actividad antibacteriana de Sargassum sinicola (Sargassaceae, Phaeophyta) y Laurecia johnstonii (Rhodomelaceae, Rhodophyta) de*

la bahía de La Paz, B.C.S., México. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias. Centro interdisciplinario de ciencias marinas. Instituto Politécnico Nacional. 64 pp.

- Chadwick Derek J., Marsh Joan and Harborne J. B. (2007). *Role of secondary metabolites in chemical defence mechanisms in plants, IN Ciba foundation symposium 154 – Bioactive compounds from plants*. John Wile and sons. Cap 10.
- C.Y. Chu; W.R. Liao; R. Huang and L.P. Lin. (2004). Haemagglutinating and antibiotic activities of freshwater microalgae. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20: 817-825pp.
- De Lara-Isasi Graciela, Álvarez- Hernández Sergio, Lozano-Ramírez Cruz y Hernández-Soto Norma. (1999). Nuevas adiciones al conocimiento de la actividad antibiótica de macroalgas marinas mexicanas. *Hidrobiologica*. 9 (2): 159-169 pp.
- Gama Fuentes, María de los Ángeles. (2004). *Biología. Biogénesis y microorganismos*. 2^{da} edición. Pearson educación. México.
- Gang-Guk Choi, Myong-Sook Bae, Chi-Yong Ahn and Hee-Mock Oh. (2008). Induction of axenic culture of *Spirulina platensis* based on antibiotic sensitivity of contaminating bacteria. *Biotechnol Lett* 30: 87–92 pp.
- Hay Mark E. (1996). Marine chemical ecology: what's known and what's next?. *Elsevier*. 200: 103-134 pp.
- Hernández López María Verónica, Hernández López María Mónica y Troccoli Luis. (2008). Actividad antibacteriana y antimicótica de *spirobranchus giganteus giganteus* (serpulidae: polychaeta) de guayacan, península de araya, estado sucre, Venezuela. *Universidad de Oriente, Venezuela*. 20 (3): 283-288 pp.

- Hutadilok-Towatana Nongporn, Reanmongkol Wantana and Panichayupakaranant Pharkphoom. (2010). Evaluation of the toxicity of *Spirulina platensis* extract. *J Appl Phycol* 22:599–605 pp.
- J. Tortora Gerard, R. Funke Berdell y L. Case Christine. (2007). *Introducción a la microbiología*. Panamericana 9^{na} edición. 559 pp.
- Jaki B., Orjala J., Bürgi H. and Sticher O. (1999). Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharmaceut. Biol.*, 37(2): 138-143 pp.
- Lara Villa Miguel Ángel, Moreno Ruiz José Luis y Amaro Mauricio Esteban Jesús. (1996). *Fitoplancton. Conceptos básicos y técnicas de laboratorio*. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. 227 pp.
- León Jorge, Liza Libia, Soto Isela, Torres Magali y Orozco Andrés. (2010). Bacterias marinas productoras de compuestos antibacterianos aisladas a partir de invertebrados intermareales. *Rev. Perú .med. exp. Salud pública*. 27(2): 125- 132 pp.
- López Duran Luis Miguel. (2007). *Actividad antimicrobiana de un diterpenoide aislado del alga de agua dulce (Oedogonium capillare)*. Tesis para obtener el grado de ingeniero químico industrial, ESQUIE Instituto Politécnico Nacional. 77 pp.
- López Simeón Roxana, Negrete Redondo Pilar y Romero Jarero Jorge. (2007). Comprobación en vivo de la capacidad antibacteriana *Oedogonium capillare* contra *vibrio fluvialis* en pez dorado *Carassius auratus*. *México, Veterinaria UNAM* 38 (004): 439 – 454 pp.
- Magallanes Claudio, Córdova César y Orozco Rita. (2003). Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. *Rev. Perú. biol.* 10(2): 125- 132 pp.
- Martínez Flores Amalia. (2007). *Propiedades antibióticas de microalgas de ambientes extremos*. tesis Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco.

- Mian P., Heilmann J., Bürgi H. and Sticher O. (2003). Biological screening of terrestrial and freshwater cyanobacteria for antimicrobial activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharmaceut. Biol.*, 41(4): 243-247 pp.
- Naranjo-Briceño Leopoldo, Rojas-Tortolero Diego, Gonzáles Héctor, Torres Parra Rubén Zegarra Narro Jorge, Sena-D'Anna Lucia y Sosa del castillo Daynet. (2010). *Spirulina platensis* como biofactoría de metabolitos secundarios de interés farmacológico: el ácido pipercolico. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal 1*: 64-90pp.
- Negrete Redondo Pilar, Figueroa Guadalupe, Jarero Romero Jorge, Simeón López Roxana. (2006). Análisis in vitro de la actividad antibacteriana de *Oedogonium capillare* contra bacterias patógenas de peces. *México. Veterinaria UNAM 37 (2)*: 209-221
- Nieto Sacramento. (2005). Enciclopedia temática universal. *Biología - El cuerpo humano - Botánica*. EMAN. 224 pp.
- Ördög V., Stirk W. A., Lenobel R., M. Bancírová, M. Strnad, J. van Staden, J. Szigeti, and L. Németh. (2004). Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. *J. Appl. Phycol.* 16: 309-314.
- P. Kausnik and Abhishek Chauhan. (2008). *In vitro* antibacterial activity of laboratory grown culture of *Spirulina platensis*. *Indian J. Microbiol.* 48:348–352 pp.
- P. Mian, J. Heilmann, H-R Bürgi and O. Sticher. (2003). Biological screening of terrestrial and freshwater cyanobacteria for antimicrobial activity, Brine Shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharmaceutical Biology*. 41(2): 243-247 pp.
- Pérez Gutiérrez Rosa Martha. (2007). Actividad antimicrobiana de *Oedogonium capillare*. Laboratorio de investigación de productos naturales, *Escuela superior de ingeniería de química e industrias extractivas IPN*. 38 (3): 26-29 pp.
- Pulz Otto and Gross Wolfgang. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 635-648.

- Ramírez Luz Stella y Castaño Marín Darwin. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Universidad Tecnológica de Pereira, *Scientia et Technica*,. 42: 263-268 pp.
- R. Murray Patrick, S. Rosenthal Ken y A. Pfaller Michael. (2007). *Microbiología Médica*. Elsevier 5^{ta} Edición 935 pp.
- Ríos-Nurby, M Gerardo., J José., Yáñez Carlos, Y. García Maria, L. Di Bernardo Maria, y Maria Gualtieri (2009) Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas marinas venezolanas. *Rev. peru biol.* 16:97-100pp.
- Rodríguez Cuesta A. Rolando y Triana Serrano F. Catherine. (2003). *Evaluación de pH en el cultivo de Spirulina spp. bajo condiciones de laboratorio*. Tesis. Bogotá, D.C., Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias.
- Rosales Loaiza Néstor Luis. (2007). *Evaluación de la actividad biológica de extractos de la cianobacteria nostoc laun 0015, en condiciones de laboratorio*. Trabajo de Grado presentado ante la División de Estudios Para Graduados para optar al grado de Magíster Scientarium en Microbiología, Universidad del Zulia. 101 pp.
- Saracco Alvarez, Marcela del Rosario. (2007). *Compuestos con actividad antibacterial producidos por las microalgas Nannochloropsis oculata y Porphyridium cruentum*. Tesis de Maestro. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 54 pp.
- Schlegel Ines, Nga Thanh Doan, Nola de Chazal and Geoffrey D. Smith. (1999). Antibiotic activity of new cyanobacterial isolates from Australia and Asia against green algae and cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology* 10: 471–479 pp.
- Torres-Ariño Alejandra. (2004). Uso de las cianobacterias en producción de antibióticos. Instituto de Industrias y Universidad del Mar. *Ciencia y Mar*. 43:53 pp.
- Vargas Solís Rosario C., Pérez Gutiérrez Rosa Martha y Figueroa Torres Guadalupe. (2011). Efecto la actividad antiespasmódica del extracto metanolico del alga *Oedogonium capillare* (Linn) Kuetz sobre ileon de rata wistar. *RESPYN*. 12 (2)

- Vidyavathi, N. and K. R. Sridhar. (1991). Seasonal and Geographical Variations in the Antimicrobial Activity of Seaweeds from the Mangalore Coast of India. *Botanica Marina* 34: 279 – 264 pp.
- Yuzuru Shimizu. (2003). Microalgal metabolites. *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier. 6:236–243 pp.