

Uso de cianobacterias en la producción de antibióticos

Alejandra Torres-Ariño*

Resumen

Uso de cianobacterias en la producción de antibióticos. Las cianobacterias se presentan como organismos capaces de inhibir el crecimiento de cepas microbianas causantes de patologías infecciosas agravadas por la resistencia de las mismas, ante la dependencia y abuso de los antibióticos actuales. Además, poseen capacidades únicas para la producción de productos naturales, con estructuras y características diferentes que les han permitido adaptarse excelentemente a condiciones extremas y habitar varios ambientes. Sus productos naturales presentan un gran potencial para diferentes aplicaciones biotecnológicas. En este estudio se evaluó la producción de sustancias con actividad antimicrobiana de 5 cianobacterias (*Limnothrix* sp., *Lyngbya* sp., *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp. y *Spirulina subsalsa*) y una comunidad de Tapete microbiano asociados a un cultivo de ostión (*Crassostrea gigas*) ante 6 cepas de microorganismos: Gram (+), Gram (-) y una levadura, aislados de pacientes con un cuadro clínico infeccioso. Se obtuvieron los extractos de cianobacterias (biomasa en fresco y liofilizada) con diclorometano, metanol y una mezcla de ambos (1:1). Los extractos de diclorometano:metanol (1:1) no mostraron actividad antimicrobiana contra ninguna de las cepas. La mayor actividad se presentó en extractos con metanol de muestras liofilizadas y con diclorometano se obtuvieron los mayores halos de inhibición. *Candida albicans* fue la

Abstract

Use of cyanobacteria in the production of antibiotics. Cyanobacteria are organisms able to inhibit growth of microbial strains responsible for infectious diseases aggravated by resistance they have acquired by the dependence and abuse of current antibiotics. Also, they possess the unique ability to synthesize certain natural products with specific characteristics and structures that have allowed them to adapt and persist extreme and wide-ranging environmental conditions. Such natural products have great potential for biotechnological applications. In this study, substances with antimicrobial activity from 5 types of cyanobacteria (*Limnothrix* sp., *Lyngbya* sp., *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp. and *Spirulina subsalsa*) and from a community of microbes, all associated with cultivated Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) were isolated. The inhibitory activity of the isolated substances was evaluated using six microorganism strains (Gram (+), Gram (-) and a yeast), isolated from patients with a clinical history of infectious disease. Fresh biomass and freeze-dried extracts of the cyanobacteria were obtained with dichloromethane, methanol, and a mixture of both (1:1). The extracts from dichloromethane:methanol (1:1) did not show anti-microbial activity against any of the strains. The greatest activity was presented by the extracts with methanol from freeze-dried samples. Extracts obtained with dichloromethane created the largest

Résumé

L'utilisation de cyanobactérie dans la production des antibiotiques. Les cyanobactéries se présentent comme des organismes capables de inhiber la croissance de cèpes microbiennes causants de pathologies infectieuses aggravées par la résistance de elles mêmes, auprès la dépendance et le abus de antibiotiques actuelles. En plus, elles possèdent des capacités uniques pour la production des produits naturels, avec des structures et caractéristiques différents qui l'ont permis de s'adapter excellemment à des conditions extrêmes et d'habiter dans plusieurs milieu. Ses produits naturels présente un grand potentiel pour de différentes applications biotechnologiques. Dans cette étude on a évalué la production de substances avec de activité microbienne de 5 cyanobactéries (*Limnothrix* sp., *Lyngbya* sp., *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp. et *Spirulina subsalsa*) et une communauté de un tapis microbienne associé à un élevage d'huîtres (*Crassostrea gigas*) auprès 6 cèpes des microorganismes Gram (+), Gram (-) et une levure isolés de patients avec un cadre clinique infectieux. On a obtenu les extraits de cyanobactérie (biomasse fraîche et lyophilisée) avec diclorométhane, méthanol et un mélange d'eux. Les extraits de diclorométhane (1:1), n'ont pas montré d'activité antimicrobienne contre aucunes des cèpes : Le majeur activité s'est présenté dans les extraits avec méthanol d'échantillons liofilisés; avec diclorométhane on a

*Instituto de Industrias, Universidad del Mar

Erratum

Durante el cambio de formato se cometieron algunos errores en el artículo de Alejandra Torres-Ariño: Uso de cianobacterias en la producción de antibióticos. *Ciencia y Mar*, VIII(23):43-52.

p: 44, Figura 1 A y B: la escala dice "10 μ ", debe decir "10 μm ".

p: 45, col. 2, párrafo 5:

línea 3: dice "100 g/mL", debe decir: "100 $\mu\text{g/mL}$ ".

línea 6: dice "200 $\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ", debe decir: "200 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ".

p: 46, col. 1, párrafo 1, línea 3: dice "20 L/mL", debe decir: "20 $\mu\text{L/mL}$ ".

col. 2, párrafo 2, línea 24: dice "50 g/mL", debe decir: "2, 5, 10, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ ".

p: 47, encabezado de la Tabla I dice "Características de los antibióticos empleados en las pruebas de antibiosis.", debe decir: "Características de los antibióticos empleados en las pruebas de antibiosis: amikacina (Am), ampicilina (Amp), cloramfenicol (Clo), gentamicina (Ge), tienam (Imi) y penicilina sódica G (PeG).".

p: 49, encabezado de la Tabla II dice "Antibióticos probados para la selección del control positivo en los ensayos de actividad antimicrobiana en cianobacterias, amikacina (Am), ampicilina (Amp), cloramfenicol (Clo), gentamicina (Ge), tienam (Imi) y penicilina sódica G (PeG).", debe decir: "Antibióticos probados para la selección del control positivo en los ensayos de actividad antimicrobiana en cianobacterias.".

única cepa que no mostró sensibilidad a los extractos. Por tal, al estar presentes en los cultivos de ostión y poseer sustancias con actividad antimicrobiana, puedan actuar como sustancias probióticas.

Palabras clave: Actividad antimicrobiana, cianobacterias, *Crassostrea gigas*, probiótico.

inhibition halos. *Candida albicans* was the only strain that did not show sensitivity to any of the extracts. The fact that such substances with antimicrobial activity are present in cyanobacteria associated with cultured oysters, suggests their potential production and use in biotechnological applications.

Key words: Antimicrobial activity, cyanobacteria, *Crassostrea gigas*, probiotics.

obtenú los majeurs halos d'inhibitions et *Candida albicans* a été la seule cèpe qui n'a pas montré sensibilité aux extraits. C'est pourquoi, sa présence dans les élevages des huîtres et pour posséder de substances avec activité microbienne, elles peuvent agir comme de substances probiotiques.

Mots clés: Activité antimicrobienne, cyanobactéries, *Crassostrea gigas*, probiotique.

Introducción

El uso indiscriminado de los antibióticos o medicamentos comerciales ha provocado que su actividad se vea limitada por la resistencia de los microorganismos causantes de las diversas patologías presentes sobretudo en las salas nosocomiales de los hospitales. Dicha resistencia es debido a que han sido capaces de desarrollar defensas más efectivas contra los antibióticos comerciales. El problema se complica cuando una bacteria o microorganismo resistente a uno o varios antibióticos es expuesta a otro medicamento, pues crea la oportunidad de generar un mutante que resista al nuevo antibiótico. Aún así se hace necesario continuar el escrutinio o prospección con otros organismos y microorganismos que presenten moléculas bioactivas con potencial biomédico.

Los microorganismos han probado ser una de las fuentes de producción de metabolitos biológicamente activos. Una de las estrategias actuales de estudio en estos campos, es la investigación o bioprospección de grupos que han sido poco estudiados en el pasado. Entre los microorganismos con gran potencial para la obtención de sustancias bioactivas con nuevas propiedades se encuentran las cianobacterias (Torres-Ariño, 2001).

Las cianobacterias (fig. 1) son microorganismos fotosintéticos que al igual que las microalgas y las plantas superiores utilizan la luz, CO_2 , agua y otros nutrimentos en la obtención de su energía necesaria para desarrollarse y crecer. Se

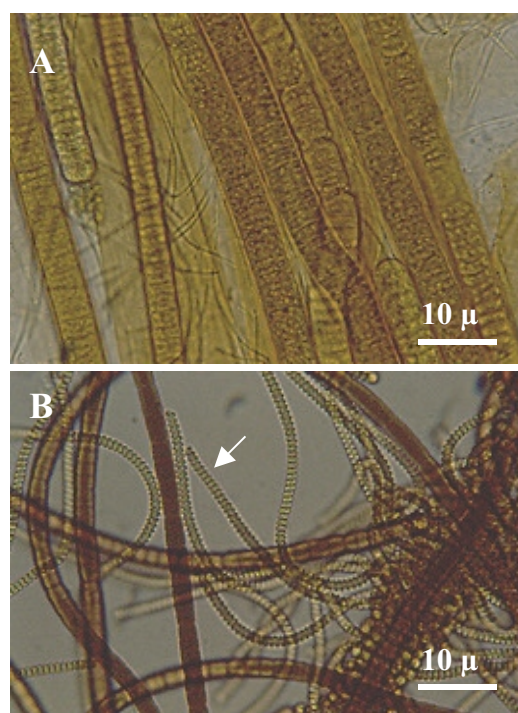


Figura 1. Cianobacterias filamentosas marinas de tapete microbiano (40X). (A) *Lyngbya* sp. (B) *Spirulina* sp. (flecha) posible *Phormidium* sp. Foto: Alejandra Torres Ariño.

presentan como organismos simples dada su ultra-estructura por lo que están clasificados como procariotas, de ahí su semejanza con las bacterias. También se les conoce como algas verde-azules por la coloración que las identifica y por su capacidad de llevar a cabo la fotosíntesis con producción de oxígeno, por lo que se incluyen dentro de la categoría de las algas. Su nombre lo reciben del prefijo griego "cyanos" que significa azul, aludiendo a su coloración verde oliva a azulada, mas sin embargo podemos encontrarlas

de varias tonalidades (López-Cortés, 1990).

Los estudios bioprospectivos con cianobacterias comenzaron en 1970, pero debido a las dificultades de colecta y a la no reproducibilidad de las muestras en laboratorio, los esfuerzos en este campo se vieron truncados y por tal motivo han recibido poca atención (Patterson *et al.* 1991). No fue sino hasta la década de los 80's, que los programas biofarmacéuticos identificaron a las cianobacterias como uno de los grupos más prominentes de microorganismos capaces de generar nuevos productos potencialmente bioactivos.

Uno de los usos potenciales de la actividad biológica de los compuestos obtenidos de las cianobacterias es su capacidad de producir sustancias antibióticas (Carmichael, 1992; Patterson *et al.* 1994; Ostensvik *et al.* 1998 y Torres-Ariño, 2001). Las propiedades antibióticas de los metabolitos secundarios de las cianobacterias en la naturaleza no están completamente entendidas, mas sin embargo, se ha observado que tienen influencia con otros organismos cercanos y la actividad antimicrobiana mostrada involucra diferentes microorganismos tanto procariotas como eucariotas. De hecho, se ha observado que las bacterias Gram (+) como Gram (-), algunos protozoarios, microalgas y otras cianobacterias son sensibles a extractos obtenidos de cianobacterias marinas y dulceacuícolas.

Las cianobacterias de ambientes terrestres y dulceacuícolas han sido las más estudiadas e investigadas para la obtención de productos naturales bioactivos; sin embargo, algunos compuestos de gran interés ya han sido obtenidos de cianobacterias marinas. Se ha observado que ciertas cianobacterias producen toxinas y excretan al medio de cultivo o a los reservorios de agua donde se encuentren, una amplia variedad de sustancias orgánicas biológicamente activas (Flores y Wolk, 1986). De ahí que los metabolitos secundarios de dichos microorganismos esten asociados a efectos tóxicos, hormonales, antineoplásicos y antimicrobianos (Carmichael, 1992; Patterson *et al.* 1994).

Para la extracción de los compuestos bioactivos de las cianobacterias se utilizan diversos disolventes, desde orgánicos y acuosos

(Ostensvik *et al.* 1998; Torres-Ariño, 2001), así como lipofílicos e hidrofílicos (Patterson *et al.* 1994). Dicha gama de naturaleza química utilizada ha conducido a la obtención de moléculas con actividades interesantes en varios rubros, desde la industrial, farmacéutica, biomédica, cosmética y alimenticia, entre otras.

Los métodos comúnmente utilizados para la determinación de la actividad antimicrobiana están basados en el principio de difusión de la capa de agar. Los efectos de inhibición que infieren en la actividad antimicrobiana, se visualizan como zonas claras o formación de halos alrededor de los sensidiscos donde va impregnado el extracto a probar. Los microorganismos comúnmente utilizados comprenden tanto organismos aislados de pacientes que presentan algún cuadro clínico como el uso de microorganismos tipo, obtenidos de colecciones reconocidas.

Por lo anteriormente expuesto, este estudio se presenta como una primera instancia de la evaluación, observación y cuantificación del efecto antimicrobiano de extractos de cianobacterias. Lo que pretende es describir las técnicas utilizadas para la obtención de los extractos y el desarrollo de los bioensayos, además de resaltar la importancia de dichos microorganismos como productores de sustancias antibióticas.

Material y métodos

Microorganismos

Las cianobacterias utilizadas en este estudio se obtuvieron de muestras de tapetes microbianos y de cultivos de ostión *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795) de la empresa Sol Azul, S.A. de C.V. en el Estero El Cardón, B.C.S., México (fig. 2).

Aislamiento de cianobacterias

El material colectado en campo se resuspendió en 20-30 mL de medio líquido y en medio sólido ASN-III (Rippka, 1988) con 100 g/mL de ciclohexamida; los cultivos se dejaron en incubación por un periodo de 4-7 días bajo una iluminación constante de 200 Em⁻²s⁻¹. Conforme fueron

presentando crecimiento se transferían a medio fresco tanto líquido como sólido. Se empleó el antibiótico cefoxitina y tienam (1 mL y 20 L/mL, respectivamente) para la eliminación de bacterias heterótrofas, asociadas a cultivos de cianobacterias (Torres-Ariño, 1997). Los métodos utilizados para su aislamiento, preservación, identificación y cultivo de las cianobacterias han sido ya descritos en detalle (Patterson *et al.* 1991; Torres-Ariño, 2001).

Preparación de las muestras

Las cianobacterias obtenidas del aislamiento fueron tratadas como muestras en fresco y como biomasa liofilizada, a partir del cual en ambos casos se llevó a cabo el procedimiento de extracción.

Obtención del extracto orgánico

Se realizaron extracciones por triplicado con cada uno de los disolventes para cada cepa de cianobacteria aislada, tanto para biomasa en

fresco como liofilizada. De ambas biomásas, se emplearon 50 mg para la preparación del extracto orgánico. Para lo cual se utilizaron como disolventes una mezcla de diclorometano:metanol (1:1) y los disolventes por separado. Gradualmente, 50 mg del material fresco y liofilizado se resuspendieron en 3 mL de la mezcla de diclorometano:metanol (1:1) y en cada uno de los disolventes por separado; se homogeneizaron por 10s para después dejarlos en los disolventes durante 10 min. Las muestras se centrifugaron a 4,500 rpm por 6 min y el sobrenadante resultante, se transfirió a otro tubo, en donde se evaporó el disolvente orgánico hasta sequedad a temperatura ambiente (24 °C) en una campana de extracción. Por último, el extracto seco se resuspendió en 1 mL de los respectivos disolventes y éstos fueron los que se utilizaron para la realización de los bioensayos.

Bioensayos antimicrobianos

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión en placa (Kirby-Bauer) (fig. 3). Los microorganismos prueba utilizados fueron: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* y *Pseudomonas aeruginosa* (Gram -), *Staphylococcus aureus* (Gram +) y *Candida albicans* (levadura). Todos los microorganismos utilizados para el bioensayo fueron aislados directamente de pacientes que presentaron un cuadro clínico infeccioso. Las cepas se obtuvieron de pacientes del IMSS (Córdoba y Puebla) y Salubridad (Oaxaca). Para la selección del control positivo o el control de sensibilidad, se utilizaron diferentes antibióticos comerciales: ampicilina, cloramfenicol, gentamicina, penicilina sódica G y tienam (Tabla I). Las bacterias Gram (+) y (-) se mantuvieron en Agar Mueller-Hinton y la Levadura en Medio Sabouraud. Los bioensayos antimicrobianos se realizaron en cultivos de Luria-Bertani como se describe en Torres-Ariño (2001), en donde los antibióticos se probaron de manera independiente a concentraciones de 2, 5, 10, 25 y 50 g/mL. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se tomó el halo de inhibición, tomando en cuenta el diámetro que ocupa el

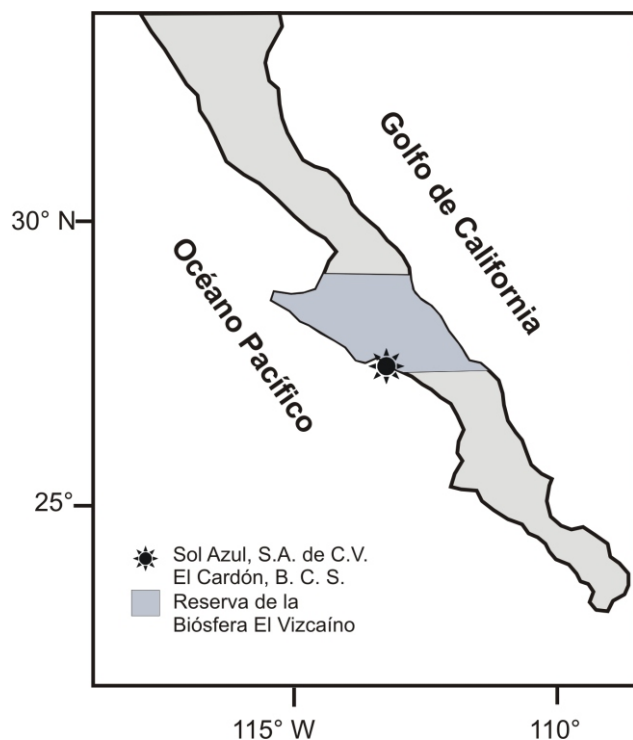


Figura 2. Localización de la zona de muestreo en el Estero El Cardón, B.C.S. Sitio de cultivo de ostión (*Crassostrea gigas*) de la empresa Sol Azul, S.A. de C.V.



Figura 3. Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en placa (Kirby-Bauer). La forma de acción se mide por la formación de halos de inhibición del crecimiento.

sensidisco hasta el punto donde se presentó un crecimiento normal de los microorganismos prueba. Se aplicaron 30 μ l del concentrado de cada uno de los extractos con los diferentes disolventes para impregnar sensidiscos estériles de 6 mm de diámetro, los cuales se mantuvieron toda la noche en una campana de extracción, a temperatura ambiente para evaporar los disolventes. Adicionalmente, sensidiscos impregnados con 30 μ l de los diferentes disolventes empleados en la extracción se trataron de la misma manera y se utilizaron como controles.

Resultados

Aislamiento de cianobacterias

Se logró un mejor aislamiento del grupo

de las cianobacterias filamentosas mediante las técnicas de sembrado en placa, transferencia por bloque invertido, el método de la gota, por la técnica de diluciones seriadas y el uso combinado de los antibióticos. El empleo de cefoxitina resultó en la eliminación de bacterias heterótrofas asociadas a las cianobacterias, mientras que el uso del tienam se restringió a exposiciones de 2 horas ya que exposiciones prolongadas (24 h) mostraron patrones de desintegración de los tricomas. La utilización de ciclohexamida, resultó efectiva en el aislamiento y limpieza de las cianobacterias, aunque más tarde, esto favoreció la aparición de bacterias heterótrofas.

En las muestras de *C. gigas* se aislaron cianobacterias filamentosas de los géneros *Oscillatoria* sp. (ECBCSCG0010-I), *Phormidium* sp. (ECBCSCG0010-II) y *Spirulina subsalsa* (ECBCSCG0010-II). Por otra parte, de los tapetes microbianos se lograron aislar las cianobacterias filamentosas *Lyngbya* sp. (ECBCSTM0010-1) y *Limnothrix* sp. (ECBCSTM0010-2) (fig. 4). Entre paréntesis se presenta la clave en donde se indica la procedencia de las muestras EC (Estero El Cardón), BCS (Baja California Sur); el tipo de muestra colectado como CG (*C. gigas*) y TM (tapete microbiano), el año y mes de colecta 00 (2000) y 10 (octubre). Por último se les dio el orden

Tabla I. Características de los antibióticos empleados en las pruebas de antibiograma.

CEPA	Am	Amp	Clo	Ge	Imi	PeG
<i>E. coli</i>	S	R	I/S	R	S	S
<i>C. albicans</i>		R	R	S	S/I	R
<i>K. pneumoniae</i>			R		S	I
<i>P. aeruginosa</i>	S		R	S	S	R
<i>P. vulgaris</i>	S	R	R		I/R	
<i>S. aureus</i>	S	S/I	R	R	I/R	S

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

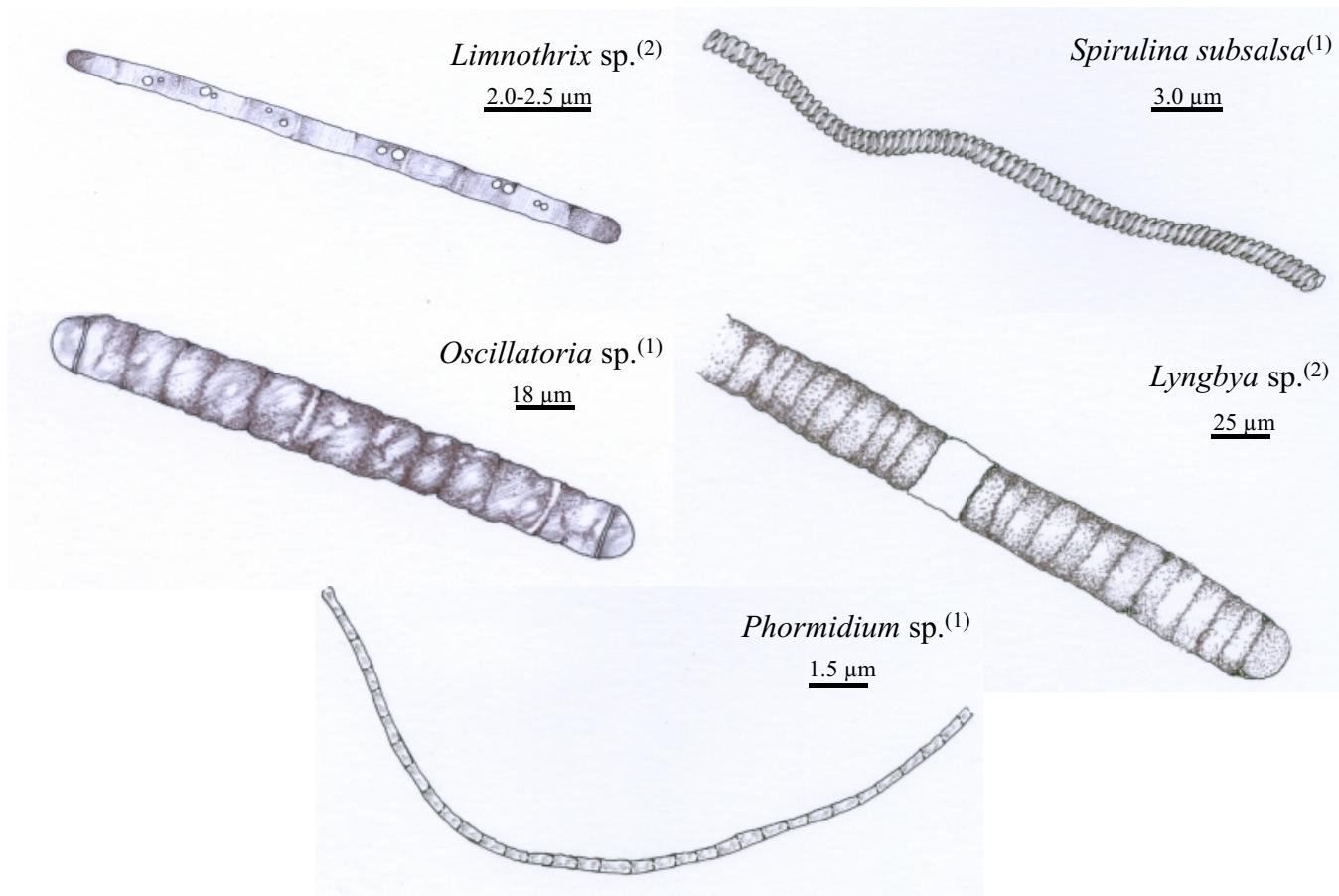


Figura 4. Cianobacterias marinas aisladas y utilizadas en la determinación de la actividad antimicrobiana. (1) Aisladas de muestras de ostión (*C. gigas*); (2) Aisladas de tapete microbiano. Dibujo: Paulina Hernández Moreno.

en el cual están depositados dentro de la colección (Laboratorio de Biotecnología de Microalgas de la Universidad del Mar, Campus Puerto Ángel), donde los números romanos y arábigos indican también el tipo de muestra.

Obtención del extracto orgánico

Se utilizaron cinco cepas de cianobacterias de las cuales se obtuvieron tres réplicas de cada extracto -diclorometano, metanol y mezcla de diclorometano:metanol (1:1)-. Se obtuvieron 9 extractos para biomasa fresca y liofilizada por cianobacteria, haciendo un total de 90 extractos a probar dentro del estudio

Bioensayos antimicrobianos

En la Tabla II se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de selección del control

positivo. De los 6 antibióticos comerciales probados, se seleccionó al tienam por ser el antibiótico que mostró halos de inhibición en todas las cepas utilizadas.

Los valores del halo de inhibición del efecto antimicrobiano de los extractos se muestran en la Tabla III. Los extractos de cianobacterias de biomasa fresca y liofilizada obtenidos con la mezcla de diclorometano:metanol (1:1) no mostraron actividad antimicrobiana contra ninguna de las cepas bacterianas utilizadas en este estudio. *C. albicans* fue la única cepa que no mostró sensibilidad a los extractos de las cianobacterias de biomasa en fresco ni liofilizada. En los extractos de cianobacterias de muestras frescas, *K. pneumoniae* fue la cepa que mostró mayor sensibilidad a los extractos (diclorometano: D y metanol: M) de las cianobacterias *Oscillatoria* sp. (D y M), *Limnothrix* sp. (D y M), *S. subsalsa* (M) y *Phormidium* sp. (M). Esta última,

Tabla II. Antibióticos probados para la selección del control positivo en los ensayos de actividad antimicrobiana en cianobacterias amikacina (Am), ampicilina (Amp), cloramfenicol (Clo), gentamicina (Ge), tienam (Imi) y penicilina sódica G (PeG).

Nombre comercial	Antibióticos					
	amikacina	ampicilina	cloramfenicol	gentamicina	tienam	penicilina G
Laboratorio	Sector salud	GRX	Sector salud	Schering-Plough	MSD	PISA
Concentración	100 g/2 mL	250 mg	500 mg	120 mg/1.5 mL	500 mg/500 mg	5 MUI
Presentación	ampolleta	cápsulas	cápsulas	sol. Inyectable	suspensión inyectable	sol. Inyectable
Principio activo	sulfato de amikacina	-	westenicol	garamicina	imipenem/cilastatina	penicilina G sódica
Tipo de antibiótico	penicilínicos-índice terapéutico	penicilínicos-índice terapéutico	a base de cloranfenicol	aminoglucosido	otros antibióticos	penicilínicos-índice terapéutico

fue la única cianobacteria que produjo un efecto inhibitorio en *E. coli*; por otra parte, *P. aeruginosa* fue sensible a extractos de metanol en las cianobacterias *Oscillatoria* sp. y *Phormidium* sp., *S. aureus* fue sensible a *Lyngbya* sp. (D), *Limnothrix* sp. (D) y a *S. subsalsa* (D-M), siendo ésta última la que mostró un efecto inhibitorio en el crecimiento de *P. vulgaris* en su extracto de diclorometano (D).

En los extractos de cianobacterias de muestras liofilizadas (ver Tabla III), se observan halos de inhibición mayores con respecto a los extractos de muestras frescas. *K. pneumoniae* fue la cepa que mostró más sensibilidad a extractos de varias cianobacterias, *Limnothrix* sp. y *Oscillatoria* sp., en su extracto con diclorometano; y en mayor grado a los extractos con metanol de *Limnothrix* sp., *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp. y *S. subsalsa*.

Los extractos de *Limnothrix* sp. (D), *Lyngbya* sp. (D) y *S. subsalsa* (D-M) inhibieron el crecimiento de *S. aureus*, siendo ésta última cianobacteria la que causo efecto en *P. vulgaris* en su extracto con diclorometano. Por otra parte, *Oscillatoria* sp. y *Phormidium* sp. fueron las únicas cianobacterias que en su extracto metanólico inhibieron el crecimiento de *P. aeruginosa*, siendo *Phormidium* sp. (M), el único extracto de cianobacterias que formó halo de inhibición de crecimiento en *E. coli*.

Discusiones

Aislamiento de cianobacterias

Para el crecimiento de las cianobacterias aisladas en éste estudio, se seleccionó al medio de

Tabla III. Halos de inhibición (diámetro en mm) del efecto antimicrobiano de extractos de cianobacterias de biomasa fresca y liofilizada del ostión (*C. gigas*) del Estero El Cardón, B.C.S., México.

	Biomasa liofilizada (organismos prueba)						
	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>S. aureus</i>	
Cianobacterias	□	□	□	□	□	□	□
<i>Limnothrix</i> sp.	- - -	- - -	- 7 11	- - -	- - -	- 7 -	-
<i>Lyngbya</i> sp.	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- 16 -	-
<i>Oscillatoria</i> sp.	- - -	- - -	- 7-10 13	ND - 7	- - -	- - -	-
<i>Phormidium</i> sp.	- - 6.5-8	- - -	- - 11	- - 8	- - -	- - -	-
<i>Spirulina subsalsa</i>	- - -	- - -	- - 6.5-8	- - -	- 8 -	- 14 8-10	-
	Biomasa en fresco (organismos prueba)						
	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>S. aureus</i>	
Cianobacterias	□	□	□	□	□	□	□
<i>Limnothrix</i> sp.	- - -	- ND -	- - 8	- - -	- - -	- 7 -	-
<i>Lyngbya</i> sp.	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	-
<i>Oscillatoria</i> sp.	- - -	- - -	- 7 7	ND ND 7	- - -	- - -	-
<i>Phormidium</i> sp.	- - 6.5	- - -	- - 6	- - 8	- - -	- - -	-
<i>Spirulina subsalsa</i>	- - -	- - -	- - 6.5	- - -	- 8 -	- 6 -	-

cultivo ASNIII (Rippka, 1988) por cumplir con los requerimientos necesarios de sales minerales y porque en estudios anteriores mostró que las cianobacterias presentan un mejor crecimiento (Rippka *et al* 1981; López-Cortés, 1990; Torres-Ariño, 1997, 2001). Existen otros medios de cultivo utilizados para el aislamiento, mantenimiento y cultivo de cianobacterias, algunos de los cuales son más selectivos como el medio SOT (ATCC medio 1679), utilizado en el mantenimiento de *Spirulina* spp. Por otra parte, para cianobacterias marinas es muy utilizado el medio MN (ATCC medio 957), el cual difiere del ASNII (Rippka, 1988) por utilizar agua de mar natural y poseer un menor aporte de sales minerales. El medio BG-11 (ATCC medio 616) (con fuente de nitrógeno) y su variante BG-11° (sin fuente de nitrógeno) es uno de los más utilizados para el desarrollo de una amplia variedad de cianobacterias fijadoras de nitrógeno de ambientes terrestres y dulceacuícolas (Allen, 1968).

Para el éxito del aislamiento de las cianobacterias, varios factores intervienen. Por un lado las condiciones de aislamiento, mantenimiento, el medio de cultivo (si es sólido o líquido) y los parámetros físico-químicos determinan la morfología y el desarrollo del cultivo. Además, la manipulación de estos organismos para su aislamiento y purificación es un proceso largo que requiere de gran cantidad de tiempo, la cual dependerá de la destreza y experiencia del manipulador.

Para el aislamiento de cianobacterias, las técnicas más utilizadas son las manuales (Rippka *et al.*, 1979). La técnica de deslizamiento y fototactismo, característica de los organismos constructores de tapetes microbianos laminados (Tovar, 1991; Torres-Ariño, 2001), favoreció el crecimiento y separación de las cianobacterias filamentosas, y el desarrollo de las unicelulares, además de ser una técnica eficiente para la eliminación de contaminantes biológicos (Rippka, 1988), especialmente de los bacilos Gram (-) (Torres-Ariño, 1997). Por otra parte, la combinación de las técnicas de dilución seriada y el vaciado en placa, permitió el aislamiento y desarrollo de las cianobacterias unicelulares, que por presentar un desarrollo más lento y aunque se sabe que las

cianobacterias unicelulares poseen mejores velocidades de crecimiento (Castenholz, 1988), no fue posible incluirlas en dicho estudio. Por otra parte, Allen (1968) sugiere que la falla del crecimiento de cianobacterias unicelulares en agar puede atribuirse al grado de sequedad de la superficie del mismo y menciona que una concentración por encima de 1.5 % de agar, actúa como inhibidor del crecimiento. En nuestro estudio se trabajó con concentraciones de 1.0, 1.5 y 2.0 % de agar y aunque las dos primeras estuvieron dentro del límite de tolerancia, no se obtuvo el aislamiento de cianobacterias unicelulares ni algunas filamentosas observadas en las muestras naturales.

Obtención del extracto orgánico

Una gran variedad de disolventes han sido utilizados en la extracción de biomasa, dentro de los cuales, el metanol, etanol, hexano y diclorometano son los más comunes y aunque varios autores (Moreau *et al.*, 1984; Kellam y Walker, 1989) han encontrado que el hexano produce las mayores zonas de inhibición, con diclorometano también se han obtenido zonas de inhibición sobre todo en microorganismos de importancia clínica como *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (Torres-Ariño, 2001) al trabajar con biomasa liofilizada. El extracto de diclorometano de las muestras liofilizadas resultó el mejor disolvente utilizado para la extracción de metabolitos con actividad antimicrobiana en este estudio. Los extractos de diclorometano-metanol (1:1) de biomasa en fresco y liofilizada tuvieron poca eficiencia, es decir, no mostraron halos de inhibición en contra de los agentes microbianos probados. Por otra parte, en los extractos metanólicos de biomasa fresca y liofilizada se presentó con mayor frecuencia la actividad antimicrobiana, siendo mayores los halos de inhibición en la biomasa liofilizada. La selección del uso de la mezcla de diclorometano: metanol (1:1) se consideró tomando en cuenta lo que se ha reportado, esto es, que es efectiva para extraer un amplio intervalo de metabolitos secundarios de naturaleza polar (Newbold *et al.* 1999). Los extractos preparados de muestras frescas (1.5 g) mostraron insignificante actividad antimicrobia-

na en comparación con los extractos crudos obtenidos de biomasa liofilizada (1 g). Posiblemente esto se deba, dado el alto contenido de agua en las muestras frescas y menor cantidad de biomasa real, las sustancias activas fueron diluidas y por tal mostraron baja actividad. Sin embargo, también se ha observado que extractos metabólicos de biomasa en fresco han mostrado ausencia de actividad antimicrobiana (Grupta y Shrivastava, 1965).

Bioensayos antimicrobianos

La actividad antimicrobiana fue poco representativa en este estudio, en cuanto al tamaño de los halos de inhibición; sin embargo se obtuvieron resultados preliminares que muestran el potencial de dichos organismos y esto se corrobora al presentar inhibición en cepas como *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Una de las posibles causas para esta observación es la poca cantidad de biomasa usada en la extracción, lo que ocasionaría una baja concentración del principio activo. No obstante, sí se observó mayor espectro de acción en comparación con un trabajo anterior (Torres-Ariño, 2001), en donde sólo se utilizaron muestras liofilizadas (0.4 g). Por otra parte, si se compara con trabajos como el de Ishida *et al.* (1997), quienes detectaron actividad en contra de *S. aureus*, la cantidad de biomasa de la cianobacteria *M. aeruginosa* fue exageradamente alta (120 g) en relación a la cantidad de biomasa empleada en este trabajo. En estudios como los de Mason *et al.* (1982) y Patterson *et al.* (1994), utilizaron cantidades bajas de biomasa (menores de 1 g) y encontraron actividad antibacteriana. Como se mencionó anteriormente, la capacidad del disolvente utilizado en la extracción (y sus características químicas), tiene que tomarse mucho en cuenta. La selección de la mezcla de diclorometano:metanol (1:1) se basó en el procedimiento descrito por Newbold *et al.* (1999) en donde encontraron actividad antibacteriana de metabolitos secundarios con naturaleza polar. Por su parte, Grupta y Shrivastava (1965) reportan ausencia de actividad antimicrobiana al utilizar metanol como disolvente, siendo contrario a lo encontrado en éste trabajo, en donde la

actividad antimicrobiana se encontró en los extractos de biomasa en fresco y mayormente en biomasa liofilizada extraída con metanol, al igual que en el trabajo de Torres-Ariño (2001), donde se observó inhibición de crecimiento en *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* de biomasa liofilizada. De igual manera se ha observado que extractos de cianobacterias que han mostrado actividad antimicrobiana, también han inhibido el crecimiento y desarrollo de nauplios de *Artemia* sp. en ensayos de toxicidad; y a su vez, éstos mismos extractos mostraron un hombro característico de toxinas presentes en grupos de cianobacterias tóxicas, como se indica en Torres-Ariño (2001) y que abre la pauta para posteriores estudios con cianobacterias de diversos ambientes.

Conclusiones

Los resultados indican que la mayor actividad antimicrobiana se presentó en los extractos obtenidos a partir de muestras liofilizadas con el metanol como disolvente, aunque los mayores halos de inhibición se obtuvieron con extractos de diclorometano. Estos estudios preliminares indican que los miembros de las cianobacterias pudieran actuar como organismos probióticos en cultivos de ostión del cual fueron aisladas.

A partir de los resultados encontrados, se vislumbra la posibilidad de que las cianobacterias aisladas en este trabajo, presenten mayor actividad antimicrobiana, empleando otros disolventes y cambiando las estrategias de extracción.

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Graciela Guerra Rivas (Laboratorio de Farmacognosia y Toxicología Marina) y a la Dra. Elizabeth Orellana C. (Laboratorio de Fitoplancton Marino) de la Universidad Autónoma de Baja California, por las facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo. A la alumna de servicio social Paulina Hernández Moreno por la realización de los dibujos y al Prof. Derek Joe Brockett y al M. en C. Carlos G. Argüelles Arredondo por la traducción del resumen (UMAR-Campus Puerto Ángel). Dicho

trabajo fue realizado gracias al apoyo brindado por la Empresa Sol Azul, S.A. y el Programa CIMO (Calidad Integral y Modernización) de la Secretaría del Trabajo y Previsión Social, clave ENSE67, dentro del Programa denominado: Manejo del Cuerpo de Agua para cultivos de ostión (en Lagunas Costeras).

Bibliografía

- Allen, M.M., 1968. Simple conditions of growth of unicellular blue-green algae on plates. *J. Phycol.* 4:1-4 p.
- ATCC medio 616. www.cyanosite.bio.purdue.edu/media/tabla/BG11.html
- ATCC medio 957. www.cyanosite.bio.purdue.edu/media/Tabla/MN.html
- ATCC medio 679. www.cyanosite.bio.purdue.edu/media/tabla/SOT.html
- Carmichael, W. W., 1992. Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.*, 72:445-459.
- Castenholz, R.W., 1988. Culturing methods for Cyanobacteria. *Methods in Enzimology.* 167:3-95 p.
- Flores, E. y C.P. Wolk., 1986. Production, by filamentous, nitrogen-fixing cyanobacteria, of a bacteriocin and other antibiotics that kill related strains. *Arch. Microbiol.* 145:215-219 p.
- Grupta, A.B. y G.C. Shrivastava, 1965. On antibiotic properties of some fresh water algae. *Hydrobiologia.* 25: 282-288 p.
- Ishida, K., H. Matsuda, M. Murakami y K. Yamaguchi, 1997. Micropeptides 478-A and B, Plasmin inhibitors from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Nat. prod.* 60:184-187 p.
- Kellam, S.J. y J.M. Walker, 1989. Antibacterial activity from marine microalgae in Laboratory culture. *Br. Phycol. J.* 24:191-194 p.
- López-Cortés, A., 1990. Microbial Mats in tidal channels at San Carlos, Baja California Sur, México. *Geomicrobiol. J.* 8:69-85 p.
- Mason, C.P., K.R. Edwards, R.E. Carlson, J.Pignatello, F.K. Gleason y J.M. Wood, 1982. Isolation of Chlorine-containing antibiotic from the freshwater cyanobacterium *Scytonema hofmanni*. *Science.* 215:400-402 p.
- Mureau, J., D. Pesando y B. Caram, 1984. Antifungal and antibacterial screening on Dycytiales from the french mediterranean coast. *Hydrobiologia.* 116/117:521-524 p.
- Newbold, R.W., P.R. Jensen, W. Fenical, y J.R. Pawlik, 1999. Antimicrobial activity of Caribbean sponge extracts. *Aquatic Microbial Ecology.* 19:279-284 p.
- Ostensvik, O., B. Skulberg y V. Hormazabal, 1998. Antibacterial properties of extracts from selected planktonic freshwater cyanobacteria - a comparative study of bacterial bioassays. *J. Appl. Microbiol.*, 84:1117-1124 p.
- Patterson, G.M.L., C.L. Baldwin, C.M. Bolis, F.R. Caplan, H. Kauso, L.K. Larsen, I.A. Levine, R.E. Moore, C.S. Nelson, K.D. Tschappat, G.D. Tuang, E. Furusawa, S. Furusawa, T.R. Norton y R.B. Raybourne, 1991. Antineoplastic activity of cultures of blue-green algae (Cyanophyta). *J. Phycol.* 27:530-536 p.
- Patterson, G.M.L., L.K. Larsen y R.E. Moore, 1994. Bioactive Natural Products from blue-green algae. *J. Appl. Phycol.* 6:151-157 p.
- Rippka, R., 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods in Enzymology.* 167:3-27 p.
- Rippka, R., B.J. Durelles, B.J. Waterbury, M. Herdman y R. Stanier, 1979. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal Genetic Microbiology.* 11:1-61 p.
- Rippka, R., J.B. Waterbury y R.Y. Stanier, 1981. Isolation and purification of cyanobacteria: some general aspects. En: Starr, P., P. Stöl, H. Trüpper, A. Balows, H. Schegel (Eds.). *The prokaryotes a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria.* 212-220 p.
- Torres-Ariño, A., 1997. Bio-remediación de cobre por cianobacterias marinas de tapetes microbianos (*Oscillatoria limnetica* y *Limnothrix amphigranulata*). Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México. 79 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. México. 94 p.
- Tovar, R. D., 1991. Aislamiento y caracterización de *Microcoleus* (Oscillatoriaceae:Cyanobacteria) de los tapetes microbianos de los canales de marea de San Carlos, B.C.S., México. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán.

Recibido: 1 de diciembre de 2003

Aceptado: 12 de abril de 2004