



“UNIVERSIDAD DE CUENCA”

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *Euglena viridis* y *Oscillatoria sp* SOBRE *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*”

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTORAS:

MARÍA VERÓNICA CAMPOVERDE ALVARADO
GLORIA VERÓNICA POMAQUIZA LEMA

DIRECTOR:

DR. FABIÁN LEÓN TAMARIZ PHD.

CUENCA – 2014

RESUMEN

El presente estudio se realizó con la finalidad de determinar la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos y clorofórmicos de la microalga *Euglena viridis* y la cianobacteria *Oscillatoria sp* sobre cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, dos especies de bacterias causantes de múltiples enfermedades en el ser humano.

Para el cultivo y aislamiento de las microalgas se utilizó los medios WC y BG-11 sólidos y líquidos, específicos para el desarrollo de microalgas de agua dulce y cianobacterias respectivamente, los mismos que se dejaron en condiciones controladas de iluminación, temperatura y agitación, para facilitar su crecimiento y desarrollo.

Los extractos para este estudio se obtuvieron por maceración asistida por ultrasonido para luego ser concentrados al vacío en el caso de los extractos clorofórmicos, y por liofilización los extractos metanólicos de ambas microalgas.

Para el análisis microbiológico, se utilizó la Técnica de Difusión en Agar Variante de Pocillo, la cual es semi-cuantitativa y permite determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de compuestos de origen vegetal, mediante la medida de los halos de inhibición alrededor de cada pocillo.

Los resultados obtenidos indican que los extractos metanólico y clorofórmico de *Euglena viridis* a concentraciones de 6 y 4 mg/mL respectivamente no tienen actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, de igual manera para *Oscillatoria sp* en la cual se probó la actividad antibacteriana hasta las concentraciones de 4 y 2 mg/mL para los extractos metanólico y clorofórmico respectivamente.

Palabras claves: *Euglena viridis*, *Oscillatoria sp*, actividad antibacteriana.

ABSTRACT

This study was conducted in order to determine the antibacterial activity of chloroform and methanol extracts of the microalga *Euglena viridis* and of the cyanobacterium *Oscillatoria* sp against bacterial strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, two bacterial species causing of multiples diseases in humans.

To the isolation and cultivation of microalgae, the WC and BG-11 solid and liquid media was used, specifics to the development of freshwater microalgae and cyanobacteria respectively, these were allowed under controlled lighting, temperature and agitation to facilitate their growth and development.

The extracts to this study were obtained by ultrasound-assisted maceration, to be concentrated under vacuum in the case of the chloroform extracts, and the methanol extracts by lyophilization of both algae.

To microbiological analysis, Agar diffusion well-variant was used, which is semi-quantitative and allows determining the minimum inhibitory concentration (MIC) of compounds of plant origin, by measuring the zones of inhibition around each well.

The results indicate the methanolic and chloroform extracts of *Euglena viridis* at concentrations of 6 and 4 mg/mL respectively do not have antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, similarly to *Oscillatoria* sp in which the antibacterial activity was tested in concentrations of 4 and 2 mg/mL for methanolic and chloroform extracts respectively.

Keywords: *Euglena viridis*, *Oscillatoria* sp, antibacterial activity.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	14
JUSTIFICACIÓN	15
CAPÍTULO I	16
1. MARCO TEÓRICO	16
1.1. Microalgas y cianobacterias.....	16
1.1.1. Microalgas	16
1.1.2. Cianobacterias	16
1.1.3. Utilidad	16
1.1.4. Estudios de Microalgas en el Ecuador	17
1.1.5. Diversidad de microalgas en las Lagunas de Estabilización de Ucubamba	17
1.2. <i>Euglena viridis</i>	19
1.2.1. Taxonomía y Morfología	19
1.2.2. Hábitat y nutrición	20
1.2.3. Reproducción	20
1.2.4. Acción antibacteriana.....	21
1.2.5. Metabolitos principales	21
1.2.6. Cultivo	21
1.3. <i>Oscillatoria sp</i>	22
1.3.1. Taxonomía y Morfología	22
1.3.2. Hábitat y nutrición	23
1.3.3. Reproducción	23
1.3.4. Acción antibacteriana.....	23
1.3.5. Metabolitos principales	23
1.3.6. Cultivo	24
1.4. Bacterias	24
1.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	24
1.4.2. <i>Escherichia coli</i>	25
CAPÍTULO II.....	27
2. MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1. RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS	27
2.2. SIEMBRA Y CULTIVO	28
2.3. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN	29
2.4. OBTENCIÓN DE BIOMASA	30

2.4.1.	<i>Euglena viridis</i>	30
2.4.2.	<i>Oscillatoria sp</i>	30
2.5.	LIOFILIZACIÓN	31
2.6.	PREPARACIÓN DE EXTRACTOS.....	31
2.6.1.	Maceración	31
2.6.2.	Concentración del extracto	32
2.7.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA SEGÚN LA TÉCNICA DE MICRODILUCIÓN EN PLACA	32
2.7.1.	Preparación de extractos	32
2.7.2.	Preparación de la placa de DMSO	33
2.7.3.	Preparación de la placa de agua	33
2.7.4.	Preparación de la placa test.....	33
2.7.5.	Lectura de la placa test.....	34
2.8.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA SEGÚN LA TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN AGAR VARIANTE DE POCILLO	34
2.8.1.	Preparación de la Solución Madre	34
2.8.2.	Microorganismos de Prueba	34
2.8.3.	Preparación de Agar Mueller Hinton	35
2.8.4.	Preparación del Inóculo Bacteriano	35
2.8.5.	Screening de extractos	35
2.8.6.	Control de Antimicrobiano	35
2.8.7.	Control de Solvente	36
CAPÍTULO III		37
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
3.1.	Aislamiento de las Microalgas	37
3.1.1.	Aislamiento de <i>Euglena viridis</i>	37
3.1.2.	Aislamiento de <i>Oscillatoria sp</i>	37
3.2.	Cultivo de las microalgas en Agua de lago	38
3.3.	Obtención de Biomasa.....	39
3.3.1.	<i>Euglena viridis</i>	39
3.3.2.	<i>Oscillatoria sp</i>	40
3.4.	Obtención de extractos.....	41
3.4.1.	Extracto Metanólico	41
3.4.2.	Extracto Clorofórmico	42
3.5.	Actividad antibacteriana	42

3.5.1. Técnica de Microdilución en Placa	42
3.5.2. Técnica de Difusión en Agar Variante de Pocillo	44
3.5.3. Prueba antibacteriana aplicada en <i>Spirulina platensis</i>	47
3.6. Discusión General	48
4. CONCLUSIONES	50
5. RECOMENDACIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52
ANEXOS	56



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, María Verónica Campoverde Alvarado, autora de la tesis “**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *Euglena viridis* y *Oscillatoria sp* SOBRE *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli***”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 21 de enero de 2014



María Verónica Campoverde Alvarado
0302022694

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Gloria Verónica Pomaquiza Lema, autora de la tesis “**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *Euglena viridis* y *Oscillatoria sp* SOBRE *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli***”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 21 de enero de 2014



Gloria Verónica Pomaquiza Lema
0603656893

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, María Verónica Campoverde Alvarado, autor de la tesis, "**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *Euglena viridis* y *Oscillatoria sp* SOBRE *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli***", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 21 de enero de 2014



María Verónica Campoverde Alvarado
0302022694

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316
e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103
Cuenca - Ecuador

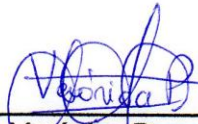


UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Gloria Verónica Pomaquiza Lema, autora de la tesis, “**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *Euglena viridis* y *Oscillatoria sp* SOBRE *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli***”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 21 de enero de 2014



Gloria Verónica Pomaquiza Lema

0603656893

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador

AGRADECIMIENTO

Le agradecemos a Dios por habernos acompañado y guiado a lo largo de nuestra carrera, por ser nuestra fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarnos un camino lleno de aprendizajes, experiencias, amistad y felicidad.

A nuestros padres que gracias a sus consejos, enseñanzas, paciencia y apoyo supieron guiarnos y alentarnos para culminar esta etapa importante en nuestras vidas.

A nuestro director de tesis Dr. Fabián León Ph.D., por aceptar ser nuestro guía en el desarrollo de esta investigación, por su orientación, supervisión, esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, experiencia, paciencia y motivación, no solo nos transmitió valores profesionales sino también valores humanos, haciendo posible la culminación de este proyecto.

También queremos hacer extensivo nuestro agradecimiento a las personas que forman parte del proyecto VLIR de Plantas Medicinales de manera especial a la Dra. Isabel Wilches, Dra. Lourdes Jerves, Dra Nancy Cuzco, BF. Andrea Abril y BF. Gabriela Jimenez, gracias por sus consejos y apoyo.

A la empresa ETAPA EP por abrirnos sus puertas y darnos las facilidades para poder realizar este proyecto, en especial al Ing. Galo Durazno.

A la Dra. Carmen Lucia López y Dra. Norma Cedillo, por habernos brindado su apoyo y ayuda, que fueron importantes para el desarrollo de este proyecto.

A nuestros amigos y compañeros de carrera, por darnos palabras de aliento y motivación en los momentos difíciles, por compartir y celebrar con nosotras momentos de alegría.

A todos ellos que Dios les colme de Bendiciones.

DEDICATORIA

A Diosito por haberme dado las fuerzas necesarias para culminar con éxito esta etapa de mi vida profesional.

A mis padres César y Zaidita por haber estado siempre a mi lado en los momentos de felicidad y triunfo pero sobre todo en los momentos más difíciles; por brindarme su apoyo incondicional, por enseñarme valores y principios para ser una buena profesional, pero sobre todo un buen ser humano. Los amo mucho.

A mis amig@s y familiares porque todos colaboraron de una u otra manera para este sueño se haga realidad, cada uno de ustedes ocupa un lugar muy especial en mi corazón, los quiero mucho.

María Verónica

DEDICATORIA

Esta tesis le dedico a Dios por protegerme y darme fuerzas para superar obstáculos y dificultades, y haberme permitido llegar hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mi Madre por haberme apoyado siempre, por sus consejos y valores, por estar presente en los momentos difíciles, pero más que nada por su comprensión y amor.

A mi padre que sin duda desde el cielo siempre me estará cuidando, guiando y bendiciendo. A ambos les debo lo que soy como persona; mis valores, mis principios, mi empeño y perseverancia para conseguir mis objetivos.

A mis hermanos por estar presentes en todo momento, a pesar de la distancia siempre están aconsejándome y apoyándome de manera incondicional.

A mis amigos por su apoyo, a través de sus locuras y ocurrencias hicieron que estos años estén llenos de felicidad y alegría.

Gloria Verónica

INTRODUCCIÓN

Las microalgas y cianobacterias representan un recurso natural aun no explotado desde el punto de vista científico e industrial. En los últimos años se han dado avances importantes en su cultivo y se han determinado diferentes usos de las mismas. Estas se presentan hoy en día como otra opción alimentaria y farmacológica, pueden utilizarse como fuente de energía, biofertilizantes o en el tratamiento de aguas negras. Además, se han logrado extraer numerosos compuestos de microalgas que sirven como antibióticos frente a bacterias e inhibidores del crecimiento de hongos y otras algas.

Este estudio pretendió determinar la actividad antibacteriana de *Euglena viridis* y *Oscillatoria sp*, especies de microalga y cianobacteria respectivamente; que se encuentran en las Lagunas Facultativa y de Maduración de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba perteneciente a la empresa ETAPA de la ciudad de Cuenca frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, especies bacterianas patógenas para el ser humano.

JUSTIFICACIÓN

En la última década ha habido un aumento significativo de la resistencia de bacterias patógenas a los agentes antibacterianos, con implicaciones directas en la morbilidad y la mortalidad humana. Por lo tanto, las investigaciones han prestado mayor atención en los mecanismos subyacentes de resistencia a los antibióticos, así como a nuevas opciones de tratamiento antimicrobiano.

En la actualidad las utilidades de las microalgas y cianobacterias están siendo investigadas, una de estas es su actividad farmacológica y muy especialmente la antibacteriana. Entre estas algas se encuentran *Euglena viridis* y *Oscillatoria sp*, las cuales pueden ser aisladas y cultivadas en medios específicos para su posterior análisis farmacológico a través de determinadas técnicas.

En nuestro medio, esta fuente natural de productos conformada por microalgas y cianobacterias no ha sido explorado a pesar del gran potencial biológico-farmacológico que poseen, por tanto, es imperativa la búsqueda de nuevos compuestos con actividad farmacológica y en particular antibacteriana a fin de establecer una línea base que a futuro resulte en opciones de tratamiento viables.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Microalgas y cianobacterias

1.1.1. Microalgas

Son un conjunto de microorganismos en su mayoría fotosintéticos, unicelulares, filamentosos que forman cadenas, colonias o cenobios. Están presentes en agua salada, agua dulce o en el suelo. Los grupos que las conforman presentan organismos con notables similitudes morfológicas, las cuales surgen como respuestas adaptativas convergentes al medio físico en el que habitan. Se consideran responsables del material orgánico que se encuentra en los ecosistemas acuáticos, así como del 40% de la fotosíntesis total del planeta. ⁽¹⁾

1.1.2. Cianobacterias

Son microorganismos fotosintéticos que al igual que las microalgas y las plantas superiores utilizan la luz, CO₂, agua y otros nutrientes en la obtención de la energía necesaria para desarrollarse y crecer. Se 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 alga 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. ⁽²⁾

1.1.3. Utilidad

Las microalgas y cianobacterias han sido durante mucho tiempo utilizadas con fines terapéuticos y en la última década se han convertido en el foco de los esfuerzos de investigación extensa; destinadas a encontrar nuevos compuestos que podrían conducir a agentes terapéuticos útiles. Es así que se ha encontrado que varias especies de estas pueden producir compuestos con

actividad antibacteriana, además de que un gran número de extractos y/o productos extracelulares han demostrado tener actividad antifúngica, antiprotozoaria, antiplasmodica, inmunoreguladora y antitumoral. ⁽³⁾

La actividad antimicrobiana de las microalgas se ha atribuido a compuestos pertenecientes a varias clases químicas, incluyendo indoles, terpenos, acetogeninas, fenoles, ácidos grasos e hidrocarburos volátiles halogenados. Sin embargo, debido muchas veces a su complejidad química y a la falta de estudios o registros previos, se puede concluir que la búsqueda de nuevos agentes activos es todavía incipiente. ⁽³⁾

1.1.4. Estudios de Microalgas en el Ecuador

En nuestro país se han realizado diferentes estudios con microalgas, sin embargo, ninguno de ellos enfocados en investigar su actividad antibacteriana, estos están dirigidos más bien a su cultivo y a la producción de biodiesel, para lo cual ya se cuenta con laboratorios de biotecnología con fines energéticos. ⁽⁴⁾⁽⁵⁾

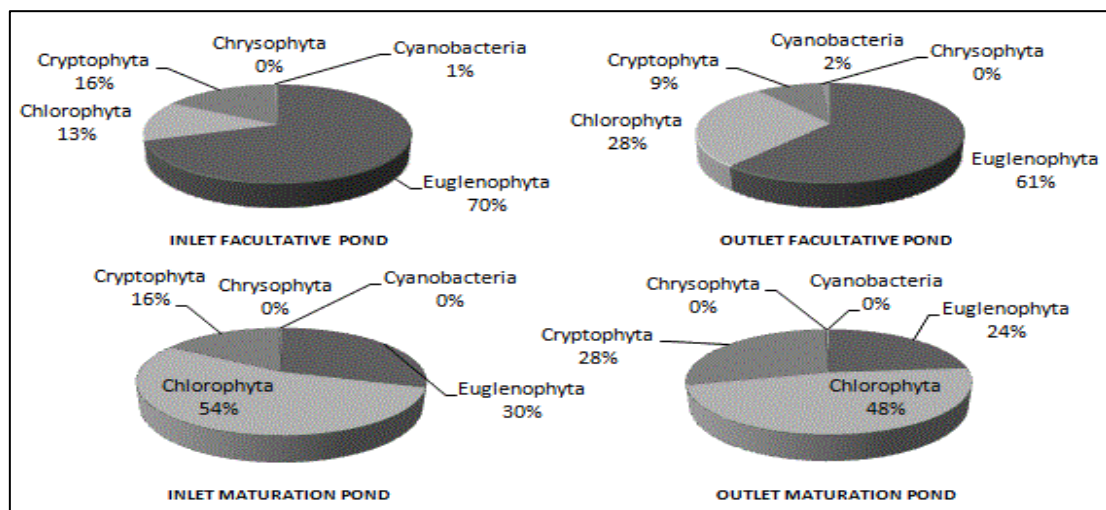
También hay estudios enfocados en determinar la presencia e identificar especies de algas en lugares aislados del Ecuador, como es el agua del glaciar Iliniza, en la cual se han encontrado especies de microalgas denominadas algas de nieve que también se encuentran en zonas volcánicas del Ecuador. ⁽⁶⁾

En nuestro medio, actualmente se están realizando investigaciones enfocadas a la identificación de especies de microalgas, en zonas como el Parque Nacional del Cajas, y el caso de las Lagunas de Estabilización de Ucubamba en las cuales se realizó un estudio de caracterización de especies de microalgas presentes es estas. ⁽⁷⁾

1.1.5. Diversidad de microalgas en las Lagunas de Estabilización de Ucubamba

Un elevado número de microalgas están presentes en la Planta de Tratamiento de Agua Residuales de Ucubamba. Las lagunas facultativas y de maduración demuestran tener una alta diversidad de especies de algas, en las cuales se encuentran cinco familias de microalgas: *Euglenophyta*, *Cryptophyta*, *Chlorophyta*, *Chrysophyta* y las cianobacterias, las cuales se encuentran distribuidas ampliamente; en la figura 1 se muestra la distribución de las microalgas en distintos lugares de las lagunas. ⁽⁷⁾

Figura 1: Distribución espacial de los diferentes grupos de microalgas en las lagunas facultativas y de maduración.



Fuente: Characterization of algal diversity and kinetics in waste stabilization ponds. (Janssens N, 2010)

1.2. *Euglena viridis*

1.2.1. Taxonomía y Morfología

Reino: Protista

Filo: *Euglenozoa*

Clase: *Euglenoidea*

Orden: *Euglenales*

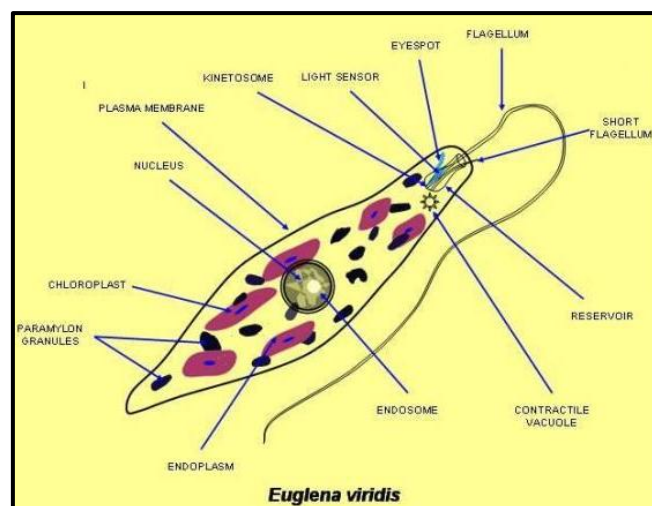
Familia: *Euglenidae*

Género: *Euglena*

Especie: *Euglena viridis*

Euglena viridis es una microalga formada por una sola célula, es un microorganismo flagelado de vida libre que muestra tanto las características de las plantas (fotosíntesis) como las características de animal (ausencia de pared celular). Presenta un cuerpo fusiforme, redondeado hacia delante y se adelgaza gradualmente hacia la parte posterior formando una punta. Mide de 40 a 60 micras de largo y 10 a 18 micras de diámetro. ⁽⁸⁾

Figura 2: Morfología de *Euglena viridis*.



Fuente: *Euglena Cell Structure*, (Pearson, 2013). Disponible en:

<http://www.tutorvista.com/biology/euglena-cell-structure>

Aunque no tiene pared celular celulósica, posee un periplasto o película semirrígida, de organización compleja compuesta por 80% de proteínas y 20 %

de lípidos y carbohidratos. Además posee dos flagelos que son responsables de su movimiento: un corto, no emergente y otro largo, emergente que le permite desplazarse con relativa rapidez. ⁽⁸⁾

Presenta de 1 a 15 cloroplastos que son en forma de estrella, gránulos de paramylon que es el producto de reserva, tiene un núcleo único y prominente, ovoide o elongado, localizado en la región central o hacia la mitad posterior de la célula que contiene uno o más nucléolos llamados también endosomas.

También posee un receptor sensible a la luz (fotosensor) y una mancha ocular o estigma prominente en el citoplasma de color rojo anaranjado, debido a la presencia de pigmentos carotenoides. Otras estructuras son el aparato de Golgi, mitocondrias y vesícula de fosfolípidos. ⁽⁸⁾⁽⁹⁾

1.2.2. Hábitat y nutrición

Se encuentra distribuida de manera abundante en la naturaleza, habita en agua dulce y salobre, su hábitat natural son arroyos y charcas con considerable vegetación y constituyen floraciones acuáticas en aquellos ambientes donde drenan aguas servidas.

Euglena es un mixótrofo: holofítico porque produce su propio alimento por fotosíntesis en sus cloroplastos, y es heterótrofo por alimentarse de materia orgánica ya elaborada, es decir necesita materiales como vitamina B12, que no pueden producir pero al igual que varios minerales, pueden absorber del medio circundante, toleran un pH muy bajo y la exposición a los rayos solares en forma directa, causa su muerte inmediata por exceso lumínico. ⁽¹⁰⁾

1.2.3. Reproducción

La reproducción es asexual por simple división longitudinal, previa mitosis. En condiciones desfavorables el flagelo es retirado, el cuerpo se vuelve esférico y

forman quistes no móviles resistentes que pueden durar hasta varios meses.
(10)

1.2.4. Acción antibacteriana

Investigaciones indican que los extractos orgánicos obtenidos de *Euglena viridis* tienen actividad antibacteriana hacia diferentes especies de bacterias patógenas entre ellas *Escherichia coli*, estos extractos son principalmente el metanólico, etanólico, y acetónico. ⁽³⁾⁽¹¹⁾

1.2.5. Metabolitos principales

La mayoría de las especies *Euglena* son de color verde debido a la presencia de cloroplastos que contienen las clorofilas a y b, además beta-caroteno, anteroxantina y neoxantina. ⁽¹⁰⁾

Euglena viridis tiene carotenoides diacetilénicos principalmente el β , β -caroteno mezclado con un poco de β , ϵ -caroteno, y carotenoides acetilénicos.
(12)

Su fracción proteica es rica en aminoácidos, principalmente ácido aspártico, ácido glutámico, treonina, serina, glicina, alanina, leucina, isoleucina, cistina entre otros. ⁽¹³⁾

Entre los carbohidratos se encuentra el polisacárido paramilón, producto de reserva, que tiene una estructura molecular lineal de unidades de glucosa en unión 1-3 glicosídica. ⁽⁸⁾

1.2.6. Cultivo

Euglena requiere medios de cultivo ricos en nutrientes orgánicos incluyendo vitaminas B1 y B12, proteínas, así como también una gran cantidad de minerales, además también suelen requerir de ácidos grasos. El medio de

cultivo para *Euglena* debe tener una gran cantidad de materia orgánica. El tiempo de generación de *Euglena* es generalmente alrededor de 10-24 horas y su temperatura óptima de crecimiento es de 26°C y bajo condiciones fototróficas a un intervalo de 4300 a 13000 lux. ⁽¹⁴⁾

1.3. *Oscillatoria* sp

1.3.1. Taxonomía y Morfología

Reino: Bacteria

Filo: *Cyanophyta*

Clase: *Chroobacteria*

Orden: Oscillatorales

Familia: *Oscillatoriaceae*

Género: *Oscillatoria*

Especie: *Oscillatoria* sp

Es una cianobacteria, alga verde azulada con características de bacteria y alga, actualmente está clasificada como bacteria, se caracteriza por estar formada por largos filamentos de células aplanadas y vaina mucilaginosa de color verde oscuro. Estos organismos no tienen órganos de locomoción pero son capaces de moverse por deslizamiento. Es filamentosa, uniseriada, simple y presenta células más anchas (13-16 μm) que altas (2-5 μm). ⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾

Figura 3: Morfología de *Oscillatoria* sp.



Fuente: The Fresh Water Algal Flora of the British Isles, (David M. Jhon., 2011)

1.3.2. Hábitat y nutrición

Oscillatoria es una de las cianobacterias más comunes en aguas dulces, vive tanto en aguas limpias como en aquellas con un alto contenido en materia orgánica. Su distribución es cosmopolita. ⁽¹⁵⁾

El desarrollo de floraciones de cianobacterias se ve favorecida por varios factores como son: el alto tiempo de permanencia del agua en el sistema acuático, el incremento de la temperatura ($> 20^{\circ}\text{C}$), intensidad luminosa o la baja turbulencia del agua, variación de pH, que junto a la eutrofización favorecen su desarrollo. ⁽¹⁷⁾

1.3.3. Reproducción

La reproducción de esta cianobacteria es asexual, se da por fragmentación del filamento que da lugar a filamentos hijos, y por formación de tricomas cortos morfológicamente distinguibles, que reciben el nombre de hormogonios, a partir de los cuales se genera un organismo completo. ⁽¹⁸⁾

1.3.4. Acción antibacteriana

Se ha demostrado que algunas especies de cianobacterias tienen actividad antibacteriana hacia bacterias gram positivas y gram negativas.

Hay estudios en donde se ha investigado la actividad antibacteriana de *Oscillatoria sp* hacia diversas especies de bacterias patógenas para el ser humano e indican que esta cianobacteria presenta acción hacia *S. aureus* y para *E. coli*, otros estudios indican que no es efectiva para ninguno de los dos tipos de bacterias. ⁽²⁾⁽¹⁹⁾

1.3.5. Metabolitos principales

Las cianobacterias producen una amplia variedad de compuestos bioactivos, que incluyen: aminoácidos, ácidos grasos, macrólidos, amidas y lipopéptidos, estos últimos incluyen compuestos con actividad diferente entre las que se encuentra la actividad antibacteriana. ⁽²⁰⁾

Los mejores metabolitos caracterizados son los terpenoides geosmina y 2-metil isoborneol; que son compuestos orgánicos volátiles. Ecológicamente estas sustancias han dado a entender que son bactericidas, y pueden facilitar el crecimiento de las algas simpátricas, aunque la naturaleza alelopática de estos compuestos ha sido objeto de debate.

Otros metabolitos producidos son las cianotoxinas, en el caso del género *Oscillatoria* son principalmente la anatoxinas y microcistinas. ⁽²¹⁾

1.3.6. Cultivo

Para el cultivo de cianobacterias se deben tener en cuenta varios factores como el suministro de CO₂, condiciones de luz y de temperatura, la mayoría de las cianobacterias crecen bien entre 20-30°C y entre 3000 a 5000 lux.

El medio más utilizado para el cultivo de las cianobacterias es el BG-11, que permite el crecimiento de una gran variedad de cianobacterias de suelo y de agua dulce, este medio se caracteriza por tener concentraciones de nitrato muy altas y concentraciones de fósforo relativamente bajas. ⁽²²⁾

1.4. Bacterias

1.4.1. *Staphylococcus aureus*

Es una bacteria inmóvil, esférica en forma de cocos, gram-positiva, de 0.8 a 1 micras de diámetro, pertenece a la familia *Micrococcaceae*, crece en grupos similares a racimos de uvas.

Es una bacteria ampliamente distribuida por todo el mundo, entre el 20% y el 40% de los adultos sanos son portadores asintomáticos del *S.aureus*, su contagio se produce mayormente de persona a persona. ⁽²³⁾

La mayor parte del tiempo habita en el cuerpo sin causar daño (flora normal), principalmente suele estar en la piel y en las membranas mucosas, pero cuando penetra en los tejidos, puede ocasionar una amplia gama de infecciones debido a la producción de toxinas. En ocasiones, puede entrar en el torrente sanguíneo desde el sitio de la infección y alcanzar otros tejidos distantes. ⁽²⁴⁾

1.4.2. *Escherichia coli*

Es un bacilo gram negativo que mide de 0,5 a 1 micra de ancho y 3 a 5 micras de largo, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, bacteria no esporulada y móvil que presenta una compleja estructura antigénica.

Forma parte de la microflora normal del intestino del hombre y los animales de sangre caliente. Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales. Su contagio se da mediante transmisión oro-fecal o hídrico-fecal, y es un importante agente nosocomial.

E. coli es una de las principales bacterias causantes de diarrea en todo el mundo, puede causar infecciones intestinales y extra-intestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía gram-negativa.

Se distinguen seis cepas según su capacidad patógena:

- *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP).

- *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET).
- *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI).
- *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH).
- *Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA).
- *Escherichia coli* de adherencia difusa (ECAD). ⁽²⁵⁾

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

Se recolectó por duplicado muestras de cada una de las Lagunas tanto Facultativa como de Maduración de la Planta de Tratamiento de Agua Residuales de Ucubamba perteneciente a la Empresa ETAPA de la ciudad de Cuenca.

Las muestras fueron obtenidas de manera aleatoria en frascos de plástico ámbar de 500 mL en lugares donde se observaron mayor desarrollo de algas; a 3 metros de distancia del borde de cada una de las piscinas y a 10 centímetros de profundidad.

Las condiciones de recolección fueron: en el horario de 11:00 am a 13:00 pm en presencia de un clima soleado.

En el siguiente gráfico se indican los puntos de muestreo en cada una de las lagunas.

Figura 4: Sitios de muestreo en las lagunas Facultativa y de Maduración.



- Sitios de recolección de la muestra.

Una vez recolectadas las muestras se procedió a su transporte en un cooler sin la adición de ningún conservante, colocándolas en refrigeración hasta la siembra de las mismas.

2.2. SIEMBRA Y CULTIVO

La siembra de las muestras se llevó a cabo después de 3 horas de su recolección. Antes de la siembra en medio sólido, se colocó entre porta y cubre 100 μ L de la muestra y se observó al microscopio Olympus CX31 (Tokio, Japón) con lente de 40x con el fin de verificar la presencia de las dos especies de microalgas a estudiar.

Después de confirmar la presencia de las microalgas, se realizó diluciones de 1/10, 1/100 y 1/1000 de las muestras con agua destilada y se colocó 200 μ L de muestra directa y de cada una de las diluciones en los siguientes medios sólidos: WC ⁽²⁶⁾, BG-11 ⁽²⁷⁾, agua de lago, y agua destilada los cuales fueron preparados de según el PNT No OG 010 del Laboratorio de Microalgas del

Proyecto VLIR de Plantas Medicinales, la siembra se realizó por la técnica de agotamiento, se selló cada una de las cajas con papel parafilm y se etiquetó.

Se colocó todas las cajas a una temperatura de 26°C con una intensidad de luz de 3000 lux.

Para el aislamiento de *Oscillatoria sp* se procedió a obtener un concentrado de la muestra para lo cual se centrifugó un total de 120 mL de muestra utilizando el equipo Sigma 2-6 (Alemania) a 3000 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 500 µL de agua destilada, de la cual se tomó 200 µL y se sembró en medio de BG-11 por la técnica de agotamiento y se procedió a incubar en las mismas condiciones.

Cada uno de estos pasos se realizó bajo cámara de seguridad biológica clase II (Labconco 3440801, USA) previamente sanitizada con etanol al 70%.

2.3. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN

Una vez que se evidenció el crecimiento de las algas que fue a los 12 días, se procedió a seleccionar cada una de las colonias y observarlas al microscopio de luz invertida Olympus CKX41SF (Tokio, Japón), con el fin de identificar la especie de alga, para lo cual previamente se hizo una revisión bibliográfica de imágenes de las especies a identificar. Se sembró una colonia en medio sólido de WC (*Euglena viridis*) y BG-11(*Oscillatoria sp*) por la técnica de agotamiento.

Una vez que se observó un crecimiento considerable que para el caso de *Euglena viridis* fue a los 8 días, mientras que para *Oscillatoria sp* fue 12 días, se procedió a comprobar su pureza preparando una placa entre porta y cubre de las colonias, y observándolas con lente de 40x del microscopio de luz invertida.

Cada 8 y 12 días se realizó el recambio de medio sólido de cada una de las algas con el fin de conservar las cepas.

2.4. OBTENCIÓN DE BIOMASA

2.4.1. *Euglena viridis*

Para la obtención de Biomasa de traspasó con ayuda de asa de punta redonda una colonia pura del medio sólido a balones fondo redondo estériles de 500 mL con medio líquido de WC, una vez colocada la colonia se procedió a instalar los balones en las condiciones necesarias para su crecimiento, las cuales fueron: aireación, agitación e iluminación (3000 lux) controladas, y temperatura entre 26 a 28°C, se dejó en estas condiciones por 8 días. En el transcurso del crecimiento se observó disminución del volumen del medio, por lo cual se tuvo que adicionar 200 mL de medio líquido a cada uno de los balones al quinto día de crecimiento.

Una vez transcurrido los 8 días se procedió a centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos, en cada ocasión se eliminó el sobrenadante y el sedimento se recolectó en un tubo sanitizado, todo el sedimento recolectado fue lavado dos veces con agua destilada.

2.4.2. *Oscillatoria sp*

Se cortó pedazos de agar de aproximadamente de 1cm x 1cm con ayuda de una asa de punta plana y se traspasaron de 8 a 10 pedazos a balones fondo redondo estériles que contenían 500 mL del medio líquido BG-11, una vez colocados los pedazos de agar con el alga, se procedió a instalar los balones en las condiciones necesarias para su crecimiento, las cuales fueron: aireación, agitación e iluminación (3000 lux) controladas, y temperatura entre 26 a 28°C, se dejó en estas condiciones por 20 días. En el transcurso del crecimiento se observó disminución del volumen del medio, por lo cual se tuvo que adicionar 200 mL de medio líquido a cada uno de los balones en el décimo día de crecimiento.

Una vez transcurrido los 20 días, los balones primero fueron sometidos a agitación con ultrasonido (Branson 3510R-DTH, México) por medio minuto, luego se cernió con el fin de eliminar los pedazos de agar que estaban

adheridos al alga, después de esto se dejó sedimentar, se recolectó en tubos sanitizados, el sedimento se lavó con agua destilada por centrifugación a 3000 rpm durante 3 minutos.

Luego de esto se colocó la biomasa en los tubos para liofilizar.

2.5. LIOFILIZACIÓN

Se pesó un tubo para liofilización vacío y seco, en el cual posteriormente se colocó la biomasa de cada una de las microalgas aforando a 20 mL con agua destilada cada tubo.

Luego se incorporaron los tubos en el Biofreezer Dairei R1-4 (Dinamarca) a -80°C rotándolo por periodos de 5 minutos para conseguir una distribución homogénea, la cual se logró en 20 a 30 minutos. Los tubos fueron almacenados por un lapso mínimo de 6 horas en el biofreezer y se procedió a cargar el liofilizador Labconco Free zone 2 (Kansas City, Missouri). Se liofilizó las muestras por un período de 20-24 horas según PNT FUN 004 del Proyecto VLIR de Plantas Medicinales. Pasado este tiempo se pesó cada tubo con la biomasa seca y con una espátula se raspó toda la biomasa de las paredes para transferirla a un tubo de tapa rosca previamente etiquetado; el cual se guardó en el Biofreezer a -20°C hasta el momento de ser utilizado en la preparación de los extractos.

2.6. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

2.6.1. Maceración

Se pesó aproximadamente 1.5 g de biomasa seca y fue colocada en un balón fondo redondo en el cual previamente se colocó 60 mL de disolvente, en nuestro caso trabajamos con Metanol grado analítico, (Merck, Darmstadt, Alemania) y Cloroformo (Merck, Darmstadt, Alemania) para análisis, el balón fue sometido a agitación con ultrasonido (Cole-Parmer 08893-21, México)

durante 3 horas evitando que la temperatura sobrepase los 35°C. Después de este tiempo se filtró el contenido del balón; de tal manera que la parte líquida se transfirió a otro balón mientras que el residuo sólido fue colocado en el mismo balón y se le adicionó 60 mL más de disolvente para ser sometido nuevamente a agitación por ultrasonido en las condiciones antes mencionadas, este procedimiento se realizó en un total de tres veces.

2.6.2. Concentración del extracto

La parte líquida obtenida fue sometida a una eliminación total del solvente en el Rota-vapor (Laborota 4000 efficient Heidolph®, Alemania) hasta sequedad.

Para la obtención del extracto metanólico se redisolvió el residuo con 20 mL de solución metanol/agua (80/20), y se traspasó a un tubo de liofilizar previamente pesado, y se liofilizó las muestras por un período de 20-24 horas según PNT FUN 004 del Proyecto VLIR de Plantas Medicinales. Después se pesó nuevamente el tubo para obtener el valor del rendimiento y finalmente fue almacenado en el biofreezer a - 20°C hasta su utilización.

Para la obtención del extracto clorofórmico después de concentrar en el Rota-vapor se redisolvió el residuo con 1-2 mL de cloroformo, se traspasó a un tubo tapa rosca previamente pesado, y se concentró con nitrógeno líquido hasta un volumen aproximado de 0,5 mL para posteriormente ser concentrado al vacío con el equipo RapidVap Labconco 64132 (Kansas City, Missouri), finalizado la concentración al vacío se pesa el tubo con el extracto y se realiza el cálculo del rendimiento.

2.7. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA SEGÚN LA TÉCNICA DE MICRODILUCIÓN EN PLACA

2.7.1. Preparación de extractos

Se pesó 5mg de cada uno de los extractos, y se los llevó a concentración de 20 mg/mL en DMSO, para lograr que se disuelvan se colocó en el rotador de tubos

(24 horas) y en el baño María, una vez comprobado que los extractos se hayan disuelto en el DMSO se procede a la preparación de las placas.

2.7.2. Preparación de la placa de DMSO

Se colocaron todos los materiales necesarios en la cámara de seguridad biológica clase II (Labconco 3440801, USA) previamente sanitizada con etanol al 70%.

Se midió con exactitud 30 μ L de DMSO, que fueron depositados en los pocillos desde la columna 3 hasta la 6 y de la 8 hasta la 11 (procedimiento por duplicado), seguidamente se colocó 20 μ L de DMSO y 20 μ L de extracto en los pocillos de la columna 2 y 7, posteriormente se pasó 10 μ L de los extractos homogenizados de la columna 2 a la 3 (DMSO) y de la columna 7 a la 8 (procedimiento por duplicado) y así sucesivamente hasta la columna 6 y 11 respectivamente, siempre manteniendo la homogenización. La placa de DMSO se debe guardar protegida de la luz y a temperatura ambiente.

2.7.3. Preparación de la placa de agua

Se colocó desde la columna 2 hasta la 11, en placas de fondo plano 80 μ L de agua estéril y se homogenizó previamente la placa de DMSO.

Se pasaron 11,76 μ L de la placa de DMSO a la placa de agua desde menor a mayor concentración y homogenizar. La placa de agua se debe guardar protegida de la luz a -4°C .

2.7.4. Preparación de la placa test

Se pasaron 10 μ L de la placa de agua previamente homogenizada, a la placa test desde la dilución más baja a la más alta, a su correspondiente. En la placa test se determina, a más de la acción antibacteriana del extracto, la viabilidad

de las bacterias y la esterilidad del medio. En la columna 12 se coloca el control del antibiótico (ampicilina), previamente preparados en diluciones decrecientes.

Se colocó TSB en la placa test en los 4 pocillos de la columna 1 desde abajo hacia arriba, permitiendo tener un control negativo. Según los cálculos obtenidos para la cantidad de pocillos de la placa (96 pocillos), se procedió a realizar la suspensión bacteriana (cryostock + TSB) tomando en cuenta el valor obtenido para el cryostock de las bacterias. Una vez preparada la suspensión bacteriana se colocó 200µL en todos los pocillos restantes. Las placas se incuban por 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$.

2.7.5. Lectura de la placa test

Se retira de la estufa las placas con el mayor cuidado posible, se homogenizaron e inmediatamente se hicieron las lecturas con la ayuda del equipo de MICROELISA (Elx800 Universal Microplate Reader).

2.8. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA SEGÚN LA TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN AGAR VARIANTE DE POCILLO

2.8.1. Preparación de la Solución Madre

Para realizar este ensayo se utilizó una solución madre de 500 µg/50µL para cada uno de los extractos de las microalgas, la cual se obtuvo al pesar 10 mg del extracto seco disuelta en 1000 µL de una solución DMSO (Merck, Darmstadt, Alemania) – Metanol (Merck, Darmstadt, Alemania) al 50%.

A partir de la solución madre se fue realizando diferentes diluciones obteniendo soluciones con concentraciones de 6, 4, 2 y 1.6 mg/ mL.

2.8.2. Microorganismos de Prueba

Para esta prueba se usaron dos cepas:

- Gram positiva: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 – LECHE)

- Gram negativa: *Escherichia coli* (ATCC25922 – LECHE)

Estas cepas se encuentran almacenadas en el biofreezer a -80°C

2.8.3. Preparación de Agar Mueller Hinton

Se preparó cajas Petri con Agar Mueller Hinton (Merck, Darmstadt, Alemania), de tal manera que la altura del agar sea de 4-5 mm en el centro de la caja, se incubó una caja por 18 a 24 horas a 37°C con el fin de controlar su esterilidad, el resto de cajas se almacenaron en refrigeración hasta pasar el control de esterilidad. Una vez garantizada la esterilidad se perforó 3 pocillos de 6mm de diámetro en cada una de las cajas a una distancia de 20 mm entre cada pocillo.

Después de realizar los pocillos en cada caja se realizó el control de esterilidad junto con el screening de cada extracto.

2.8.4. Preparación del Inóculo Bacteriano

Se preparó un Patrón de Mc Farland 0.5 (Clinical and Laboratory Standards Institute®, 2013), teniendo una concentración final de bacterias $1,8 \times 10^8$ UFC/mL para *E. coli* mientras que para *S. aureus* fue de $1,5 \times 10^8$ UFC/ mL.

2.8.5. Screening de extractos

Con un hisopo estéril se inoculó la suspensión de cada una de las bacterias en las placas de agar, se dejó reposar 15 minutos, después se inoculó 50 µL en los pocillos cada una de las concentraciones por triplicado de los extractos de ambas microalgas.

Luego de la inoculación se dejó 30 minutos en estufa para facilitar la difusión de los extractos, pasado los cuales se procedió a invertir las cajas y a incubarlas por 18 a 24 horas a 37°C en condiciones aeróbicas. ⁽²⁸⁾

2.8.6. Control de Antimicrobiano

Como control positivo se utilizó para *S. aureus* y *E.coli* Ampicilina (Laboratorios Life, Lote: 13-0446), para *S. aureus* se tomó como referencia puntos de corte de 0.5 a 2 µg, y para *E.coli* de 2 a 8 µg ⁽²⁹⁾, preparando soluciones con concentraciones de: 10, 8, 4, 3, 2, 1, 0.5 y 0.25 µg las cuales estaban contenidas en 50µL, cantidad que fue inoculada en los pocillos por duplicado para cada una de las bacterias.

2.8.7. Control de Solvente

Se inoculó por triplicado para cada una de las bacterias 50 µL de DMSO/ Metanol (50/50).

CAPÍTULO III

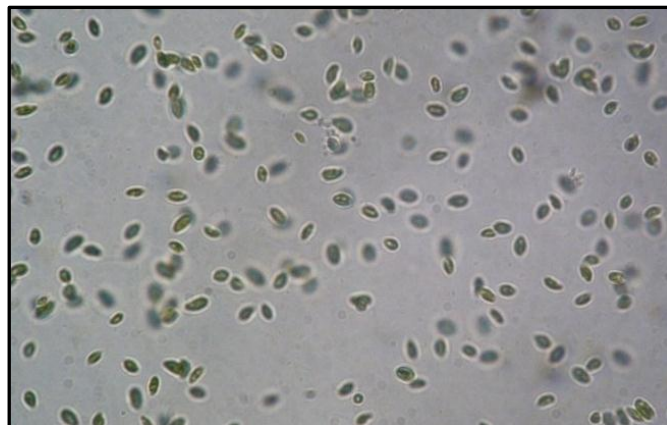
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aislamiento de las Microalgas

3.1.1. Aislamiento de *Euglena viridis*

Se logró aislar colonias puras en el medio WC sólido a la dilución 1/1000 de la laguna facultativa a los 12 días de siembra, las cuales eran de color verde, redondas, pequeñas y al observarlas al microscopio se comprobó la presencia de *Euglena viridis* completamente pura como se puede observar en la Figura 5.

Figura 5: Colonias de *Euglena viridis* vistas al microscopio (40x).



Se obtuvo crecimiento importante en medio sólido a partir del sexto día post-siembra. Se traspasó a nuevo medio sólido a partir del octavo día. Una vez conseguido el crecimiento en este medio se transfirió a medio líquido en el cual se pudo observar crecimiento importante (coloración verde intensa) a partir del cuarto día. Se colocaron alícuotas a nuevos balones hasta obtener biomasa suficiente.

3.1.2. Aislamiento de *Oscillatoria sp*

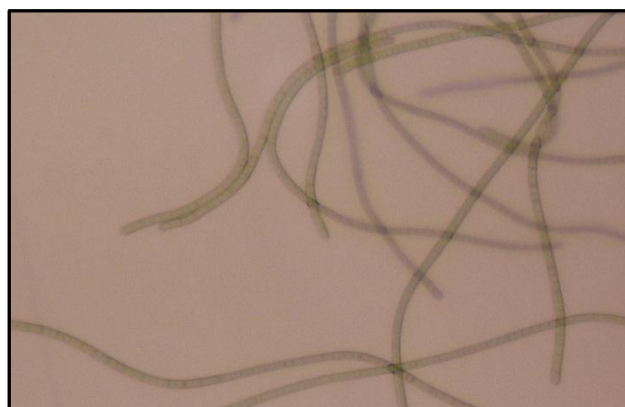
La microalga se logró aislar en el segundo muestreo, evidenciándose crecimiento al octavo día post- siembra únicamente en las muestras de la laguna facultativa, al mismo tiempo se observó la formación de colonias cafés irregulares, que al enfocarlas al microscopio se observó la presencia de *Nitzschia sp.*

Se realizó resiembras sucesivas pero no se logró cultivarla pura en medio sólido, observándose únicamente el crecimiento de *Nitzschia sp*, por este motivo se sembró en cajas petri más grandes para obtener biomasa por raspado, sin lograr un buen crecimiento pues a medida que el alga se expandía por la caja el medio se agotaba y limitaba su desarrollo.

Con todos estos inconvenientes, se decidió cortar pedazos de agar con el alga y traspasarlos a medio líquido, obteniéndose excelentes resultados de crecimiento pero con presencia de contaminante.

El aislamiento de la microalga se logró al traspasar hifas del medio líquido al medio sólido, para después a partir de su aislamiento obtener biomasa en medio líquido como se puede observar en la Figura 6.

Figura 6: Colonias de *Oscillatoria sp* observadas en el microscopio (40x)



3.2. Cultivo de las microalgas en Agua de lago

Se intentó cultivar ambas especies de microalgas en su medio natural (agua de laguna) para obtenerlas con un desarrollo y metabolismo similar al que mantienen en el ambiente natural en el que habitan.

Para este propósito se esterilizó el agua de la laguna, y posteriormente se sometió a un proceso de filtración con gasa estéril bajo cabina de flujo laminar, se realizó control de esterilidad del agua sembrando en agar tripticasa soya, dando un resultado negativo a las 48 horas.

A los 8 días de haber realizado la siembra se vio un buen crecimiento de *Euglena viridis*, en el caso de *Oscillatoria* el crecimiento fue más lento, pero cuando se observó al microscopio se evidenció contaminación bacteriana en ambos cultivos, esto podría ser debido a la carga de materia orgánica presente en el agua.

Después de ver este resultado se decidió, esterilizar el agua, posteriormente centrifugar para reducir la carga de materia orgánica, y volver a esterilizar el agua centrifugada, una vez realizado esto, se sembró cada una de las microalgas y además se hizo un control de esterilidad del agua. En este caso no se obtuvo crecimiento para *Euglena*, *Oscillatoria* creció sobre los pedazos de agar, adhiriéndose al balón; pero sin incremento del crecimiento, por lo que este método no resultó útil para el cultivo de estas algas debido a la reducción de nutrientes necesario para su crecimiento.

3.3. Obtención de Biomasa.

3.3.1. *Euglena viridis*

Para garantizar la integridad celular de la microalga, se probaron diferentes velocidades y tiempos de centrifugación, determinando que para este propósito se debería centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos.

Los resultados obtenidos fueron: por cada dos litros de medio líquido se consiguió un rendimiento aproximado de 500 mg de biomasa liofilizada obteniéndose un total de **6940.2 mg** como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Rendimiento de biomasa liofilizada de *Euglena viridis*.

Volumen de medio líquido (L)	Rendimiento de biomasa liofilizada (mg)
2	559.9
3,5	960.5
3	805.2
2	525.3
3.8	980.5
4	1125.5
4	1012.6
3.5	970.7
25.8	6940.2

3.3.2. *Oscillatoria sp*

Los resultados obtenidos fueron: por cada dos litros de medio líquido se consiguió un rendimiento aproximado de 1500 mg de biomasa liofilizada obteniéndose un total **7809.1 mg** como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Rendimiento de biomasa liofilizada de *Oscillatoria sp.*

Volumen de medio líquido (L)	Rendimiento de biomasa liofilizada (mg)
2	1277.4
2	1740.3
2	1556.8
4	3234.6
10	7809.1

3.4. Obtención de extractos

3.4.1. Extracto Metanólico

En la tabla 3 se presenta el rendimiento del extracto metanólico de las dos especies cultivadas.

Tabla 3: Rendimiento del extracto metanólico.

Microalga	Peso biomasa liofilizada (mg)	Rendimiento extracto (mg)	Rendimiento de extracto (%)
<i>Euglena viridis</i>	1400	119.7	8.55
	1500	167.4	11.16
<i>Oscillatoria sp</i>	1500	178.8	11.92
	1500	187.5	12.5

3.4.2. Extracto Clorofórmico

En la tabla 4 se presenta el rendimiento del extracto clorofórmico de las dos especies cultivadas.

Tabla 4: Rendimiento del extracto clorofórmico.

Microalga	Peso biomasa liofilizada (mg)	Rendimiento extracto (mg)	Rendimiento de extracto (%)
<i>Euglena viridis</i>	1400	149.7	10.69
	1500	158.8	11.58
<i>Oscillatoria sp</i>	1500	185.8	12.38
	1500	176.9	11.79

3.5. Actividad antibacteriana

3.5.1. Técnica de Microdilución en Placa

Para esta técnica primero se probó la solubilidad de los extractos con DMSO y metanol como disolventes obteniéndose buena solubilidad a una concentración 50 % DMSO/ Metanol como se indica en la siguiente tabla:

Tabla 5: Solubilidad de los diferentes extractos de las microalgas.

Microalga	Extracto	Solvente	Solubilidad
<i>Euglena viridis</i>	Metanólico	DMSO 100%	Ligeramente soluble
		DMSO /metanol (75/25)	Ligeramente soluble
		DMSO /metanol (50/50)	Soluble
	Clorofórmico	DMSO 100%	Insoluble
		DMSO /metanol (75/25)	Ligeramente soluble
		DMSO /metanol (50/50)	Soluble
<i>Oscillatoria sp</i>	Metanólico	DMSO 100%	Insoluble
		DMSO /metanol (75/25)	Ligeramente soluble
		DMSO /metanol (50/50)	Soluble
	Clorofórmico	DMSO 100%	Insoluble
		DMSO /metanol (75/25)	Ligeramente soluble
		DMSO /metanol (50/50)	Soluble

Por esta técnica la concentración final más alta empleada fue de 64 µg/mL, en este caso no hubo actividad antibacteriana de ninguna de las dos algas, además de que hubo interferencia de color, lo cual se reflejó en la secuencia de las lecturas de cada pocillo. Por lo tanto esta técnica no resultó ser la

adecuada para probar la actividad antibacteriana en estas microalgas, por ser extractos muy pigmentados.

Por esta razón se pensó desarrollar la técnica de macrodilución, que permite el uso de mayor concentración de extractos, sin embargo esto resulta ser una limitación debido a que el tiempo para obtener la cantidad de biomasa necesaria es demasiado largo puesto que el rendimiento de las microalgas es bajo, además el color seguiría siendo una limitación

Debido a estos inconvenientes no fue posible el uso de esta técnica con nuestros extractos por lo que se decidió el empleo de la técnica de difusión en placa variante de pocillo.

3.5.2. Técnica de Difusión en Agar Variante de Pocillo

Para comprobar la validez de la técnica se realizó el control positivo de antibiótico empleando la Ampicilina, tomando como referencia los puntos de corte recomendado por la CLSI ⁽³¹⁾ para ambas bacterias. En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 6: Control de Antibiótico (Ampicilina)

Bacteria	Concentración (µg)	Inhibición (mm)
<i>E. aureus</i>	0.25	0
	0.5	15
	1	23
	2	28
	3	30
<i>E.coli</i>	1	0

	2	0
	4	11.5
	8	17
	10	18

Esta técnica se realizó inicialmente con el extracto metanólico de *Euglena viridis* hasta una concentración de 80 µg⁽¹¹⁾, dándonos actividad negativa para *E. coli*, por lo que se decidió elevar la concentración hasta 500 µg, pero al momento de realizar las disoluciones en caldo tripticasa soya este precipitó, entonces se decidió utilizar como solvente para las diluciones DMSO/ Metanol al 50 %, pero se presentó como limitante la solubilidad, problema que se evidenció en los pocillos de las cajas en los cuales se observaba el extracto adherido.

Para mejorar el problema de la solubilidad y verificar que los solventes no tengan actividad antibacteriana se realizó una prueba con estos a diferentes concentraciones como se indica en la tabla 7, siendo el solvente adecuado el DMSO/ metanol al 50%, para el caso del extracto metanólico, que fue inicialmente empleando para la preparación de los extractos, debido a que el metanol nos dio leve actividad a una concentración entre 60 a 90% e iba interferir en la medición de los halos de inhibición dándonos falso positivo. En el caso del extracto clorofórmico el solvente adecuado fue el Cloroformo/ DMSO (25/75).

Tabla 7: Control de Actividad Antibacteriana de solventes.

Bacteria	Solvente	Concentración (%)	Resultado
<i>E. coli</i>	Metanol	90	Positivo
		80	Positivo
		70	Positivo
		60	Positivo
		50	Negativo
	Cloroformo	25	Negativo
		12.5	Negativo
<i>S. aureus</i>	Metanol	90	Positivo
		80	Positivo
		70	Positivo
		60	Positivo
		50	Negativo
	Cloroformo	25	Negativo
		12.5	Negativo

También se intentó mejorar la solubilidad mediante la eliminación de la clorofila de los extractos metanólicos mediante partición en solventes. Con los extractos sin clorofila de ambas microalgas y con el solvente adecuado se realizó nuevamente la técnica usando concentraciones hasta de 500 μg hacia *E. coli*, pero la solubilidad no mejoró y el resultado fue negativo, por lo que se intentó reproducir la técnica empleada en la determinación de la actividad antibacteriana de la *Spirulina platensis* ⁽³⁰⁾ para ver si era factible aplicar esta técnica con los extractos de *Euglena* y *Oscillatoria*.

3.5.3. Prueba antibacteriana aplicada en *Spirulina platensis*

Se realizó la técnica de Microdilución en Placa recomendada por el National Committee for Clinical Laboratories Standards 2004 en la cual la concentración final empleada es de 512 µg/mL. ^{(30) (31)}

Para realizar esta prueba previamente se realizó la eliminación de clorofila en los extractos metanólicos de las microalgas con la columna de extracción de fase sólida LiChrolut[®] C-18 (Merck, Darmstadt, Alemania) a fin de evitar la interferencia de color en el momento de hacer la lectura en el equipo de Microelisa. En la tabla 8 se indica el rendimiento de los extractos sin clorofila de ambas microalgas.

Tabla 8: Rendimiento del extracto metanólico sin clorofila.

Microalga	Peso extracto (mg)	Rendimiento extracto (mg)	Rendimiento de extracto (%)
<i>Spirulina platensis</i>	30	2.1	7
<i>Euglena viridis</i>	23	4	17.39
<i>Oscillatoria sp</i>	31	5.8	18,71

La técnica se realizó primero con los extractos metanólicos como tales y sin clorofila de *Spirulina platensis*, el solvente inicial empleado fue DMSO/Metanol al 50 %, tomando como referencia a la técnica en la cual se recomienda utilizar el solvente adecuado ⁽³⁰⁾, logrando reproducir los resultados obtenidos en el artículo de referencia.

Una vez obtenidos estos resultados, se decidió aplicar la técnica con nuestros extractos, pero al momento de realizar el control de solvente, que no es mencionado en el artículo de *Spirulina*, este dio inhibición de crecimiento bacteriano, debido a este resultado se efectuó el control del solvente a

diferentes concentraciones siendo la idónea DMSO/Metanol 95/5. En este caso no hubo inhibición de crecimiento de las bacterias, pero se evidencio la interferencia de color lo cual produjo alteración en los valores de las lecturas, hecho que podría ser debido a la presencia de otros pigmentos en los extractos, a pesar de tener la ventaja de emplear una concentración alta de extracto, el limitante nuevamente fue la presencia de color.

Con estos resultados se decidió aplicar nuevamente la técnica de difusión en placa variante de pocillos, en la cual no hay interferencia de color, y que nos permite emplear concentraciones superiores a las técnicas antes mencionadas.

3.6. Discusión General

Para el desarrollo de la técnica de difusión en placa variante de pocillos los extractos fueron disueltos en DMSO/metanol al 50%, teniendo buena disolución y difusión de los extractos hasta una concentración de 6 y 4mg/mL para el extracto metanólico y clorofórmico respectivamente para el caso de *Euglena viridis*, para *Oscillatoria sp* las concentraciones fueron 4 y 2 mg/mL. La solubilidad de los extractos nos permitió probar la actividad antibacteriana solo hasta estas concentraciones y como resultado no hubo actividad antibacteriana para *E. coli* y *E. aureus*. Cabe recalcar que a concentraciones superiores puede darse actividad antibacteriana, y que en esta investigación no se pudo de demostrar debido a que al subir la concentración hasta los 10 mg/mL, los extractos eran insolubles en todos los solventes probados y no permitía la difusión total del extracto quedándose residuos al fondo del pocillo y adherido en la pared de agar.

La solubilidad nos representó un serio problema, a pesar de haber empleado concentraciones superiores a las indicadas en estudios previamente realizados con *Euglena*, la actividad antibacteriana fue negativa. Artículos consultados indican que los extractos orgánicos de *Euglena viridis* tienen actividad antibacteriana hacia diferentes especies de bacterias patógenas entre ellas *E. coli* para la cual la MIC fue de 60 µg/mL con el extracto etanólico empleando la técnica de difusión en disco.⁽¹¹⁾

Además estos estudios señalan que la actividad antibacteriana se debe a diferentes agentes químicos presentes en el extracto, incluyendo flavonoides, triterpenoides y otros compuestos de naturaleza fenólica o con un grupo hidroxilo libre, todos estos clasificados como compuestos antimicrobianos activos.

El mismo problema se presentó para *Oscillatoria sp* siendo los extractos de esta microalga menos solubles comparados con los extractos de *Euglena viridis*, por lo cual no se probó la actividad antibacteriana a las concentraciones de referencia dadas en los artículos de Vijayakumar et al. ⁽¹⁹⁾ y Prabakaran ⁽³²⁾ en los que las concentraciones empleadas son superiores a las aplicadas en este estudio utilizando la misma técnica, y en el que se indica que el género *Oscillatoria* tiene actividad para *E. coli* y *S. aureus*.

Además se indica que la variación en los resultados obtenidos se debe al tipo de extracto utilizado y del área de donde se tomaron las muestras, ya que las algas podrían presentar mayor o menor actividad dependiendo de la variedad y cantidad de nutrientes disponibles para su crecimiento, de ahí que se intentó cultivarlas directamente en el agua en donde crecen. ⁽¹⁹⁾

4. CONCLUSIONES

- La microalga *Euglena viridis* no presenta actividad antibacteriana hacia *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* a concentraciones de 6 y 4 mg/mL para el extracto metanólico y clorofórmico respectivamente.
- La cianobacteria *Oscillatoria sp* no presenta actividad antibacteriana hacia *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* a concentraciones de 4 y 2 mg/mL para el extracto metanólico y clorofórmico respectivamente.

5. RECOMENDACIONES

- Para la técnica de microdilución se recomienda realizar las lecturas por inmunofluorescencia, debido a que las microalgas tienen compuestos coloreados que interfieren en las lecturas.
- Probar otros solventes para la obtención de extractos ya que hay estudios que indican que otros extractos orgánicos de estas microalgas tienen actividad antibacteriana a concentraciones similares probadas en este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. López S., Catzim L., (2003). "Microalgas Dulceacuicolas", en *Revista de Biodiversidad y Desarrollo Humano*, [en línea]pg.165, México, Disponible en: <http://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Sitios/Biodiversidad/pdfs/Cap4/02%20Microalgas.pdf>
[Fecha de consulta: 1 de abril de 2013]
2. Torres-Ariño,A., (2004)"Uso de Cianobacteria en la Producción de Antibióticos", *Ciencia y Mar*[en línea]; vol. 23 no.1, pg. 43-52. Disponible en: <http://www.umar.mx/revistas/23/cianobacterias.pdf>
[Fecha de consulta: 14 de Abril de 2013]
3. Amaro E., Guedes C., Malcata X., (2011). "Antimicrobial Activities of Microalgae: An Invited Review", en *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, [en línea].pg. 1272-1277, Portugal.
Disponible en: <http://www.formatex.info/microbiology3/book/1272-1284.pdf>
[Fecha de consulta: 1 de abril de 2013].
4. González A., (2000), *Alternativas en el Cultivo de Microalgas* [Tesis previo a la obtención del título de Acuicultor], Guayaquil: Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias de Mar, Escuela Superior Técnica del Litoral. Disponible en: http://www.cib.espol.edu.ec/Digipath/D_Tesis_PDF/D-22897.pdf
5. Dávila A., (2013), *Evaluación de las Condiciones de Cultivo Autotrófico de Microalgas Chlorella para la Producción de Biodiesel* [Tesis previo a la obtención del título de Ingeniera Ambiental], Quito: Colegio de Ciencias e Ingenierías, Universidad San Francisco De Quito. Disponible en: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/2404/1/107095.pdf>
6. Nedbalová L., (2008). "Nuevos registros de algas de los nevados andinos Ecuatorianos", en *Portal Revistas Peruana*. Volumen 15, Número. 1. Enero-Junio, Trujillo. Disponible en:

- http://revistas.concytec.gob.pe/scielo.php?pid=S1815-82422008000100002&script=sci_arttext
7. Janssens N., (2009-2010), *Characterization Of Algal Diversity And Kinetics In Waste Stabilization Ponds. Spatialdistribution of thealgae in the WSP* [Tesis previo a la obtención del título de magister], Bélgica: Facultad de Ingeniería de Biociencias, Universidad de Gante
 8. MetaMicrobe, (2011), "*Euglena spp.*"[en línea]. Disponible en: <http://www.metamicrobe.com/euglena/>
[Fecha de consulta: 2 de Abril de 2013].
 9. Guillen A., (2009), "*Euglena viridis*, planta y animal a la vez". [en línea].Rioja, España. Disponible en: <http://www.flickr.com/photos/microagua/3226101077/>
Fecha de consulta: 2 de Abril de 2013].
 10. Guzman J., (2009), "Breve Reseña de Exposición sobre la Euglena", [en línea]. República Dominicana. Disponible en: <http://jarvikguzman.blogspot.com/2009/09/breve-resena-de-exposicion-sobre-la.html>
[Fecha de consulta: 2 de abril de 2013].
 11. Das B., Pradhan J., Pattnaik P., Samantaray B., Samal S., (2005). "Production of antibacterials from the freshwater alga *Euglena viridis*". en World Journal of Microbiology and Biotechnology [en línea] pg. 45-50, India, Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11274-004-1555-3>
 12. Fiksdahl A., Liaaen-Jensen., (1988) "Diacetylenic carotenoids from *Euglena viridis*", Phytochemistry [en línea], pg. 1447-1450. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031942288802139>
 13. Ambler R., Kamen M., Bartsch R., Meye T., (1991) "Amino Acid Sequences Of *Euglena Viridis* Ferredoxin And Cytochromes c", en U.S. National Library of Medicine [en línea], Vol. 276, nro.1, pg. 47-52, Arizona-USA. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1151141/?page=1>
 14. Gantt E., Janet R., Taylor S.,(2004) "Euglena. Developmental and Cytological Methods", [en línea], Tercera Edición, pg. 109-117 New-York, Cambridge University. Disponible en: <http://books.google.com.ec/>

15. Fuenmayor G., Jonte L., Rosales-Loaiza N., Morales E., (2009). "Crecimiento de la cianobacteria marina *Oscillatoria* sp. MOF-06 en relación al pH en cultivos discontinuos", en *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* [en línea] vol. 21. pg. 21-25. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/pdf/rsvm/v29n1/art05.pdf>
16. Jhon D., Whitlon B., Brook A., (2011) "The Fresh Water Algal Flora of the British Isles", Segunda Edición, Cambridge University Press, Cambridge.
17. De León L., (2000), "Floraciones algales de agua dulce: cianobacterias, cianotoxinas y su relación con la salud", [en línea]. Disponible en: <http://limno.fcien.edu.uy/pdf/floraciones-de-cianobacterias.pdf>.
[Fecha de consulta: 9 de abril de 2013].
18. Stainer R., Ingraham J., Wheelis M., Painter P., (1992), *Microbiología, Eubacterias fotosintéticas*, pg. 393, Segunda Edición. Editorial Reveté S.A, Barcelona. Disponible en: <http://books.google.com.ec/>
19. Madhumathi V., Deepa P., Jeyachandran S., Manoharan C., Vijayakumar S., (2011). "Antimicrobial Activity of Cyanobacteria Isolated from Freshwater Lake", en *International Journal of Microbiological Research*, pg.213-215, India.
20. Singh S., Bhushan N., Banerjee U., (2005). "Bioactive Compounds from Cyanobacteria and Microalgae: An Overview", en *Critical Reviews in Biotechnology*, pg. 73-95.
21. Amsler C., (2008). "Macroalgal and Cyanobacterial Chemical Defenses in Freshwater Communities", en *Algal Chemical Ecology*, Primera Edición, pg. 105-110, Alemania.
22. Leganés F., Bolaños L., (2003). "Técnicas Experimentales en Biología Vegetal", en *Universidad Autónoma de Madrid* [en línea], Madrid. Disponible en: http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/bolarios/Doctorado/guiontebv.htm#Tema%202.1
23. Schnurman k., (2013). "El *Estafilococo aureus* y sus Características Bioquímicas" [en línea], en Demand Media, Madrid. Disponible en: http://www.ehowenespanol.com/estafilococo-aureus-caracteristicas-bioquimicas-sobre_44034/

[Fecha de consulta: 15 de abril de 2013]

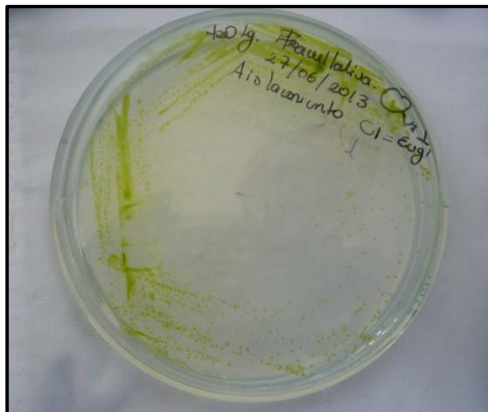
24. Montane Lozoya J.,(2011), “Bacteria Staphylococcus aureus: síntomas, contagio y tratamiento”, [en línea]. Disponible en:http://www.ehowenespanol.com/estafilococo-aureus-caracteristicas-bioquimicas-sobre_44034/

[Fecha de consulta: 15 de abril de 2013].

25. Jawetz, Melnick y Adelberg., (2005) “*Enterobacteriaceae*. Microbiología médica” *Manual Moderno*, 18ª edición, pg. 243-256, España.
26. Andersen R., (2005). *Recipes for Freshwater and Seawater Media. Algal Culturing Techniques*, Elsevier Academic Press, USA.
27. Banco Español de Algas, (2013) “BG-11 listo para usar” [en línea], España. Disponible en: <http://bea.marinebiotechnology.org/es/component/virtuemart/medios-de-cultivo/bg11-listo-para-usar-detail?Itemid=0>
28. Valgas C., Machado de Souza S., Samania E. y Samania A., (2007) “Screening Methods to Determinate Antibacterial Activity Of Natural Products” en *Brazilian Journal of Microbiology*, Número 38, pg. 369-380
29. Clinical and Laboratory Standars Institute®, (2013). “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement”, Volumen 33, Número 1, USA.
30. Kaushik P.; Abhishek C., (2008). “*In Vitro* Antibacterial Activity of Laboratory Grown Culture of *Spirulina platensis*”, en *Indian J. Microbiol.* Número 48, pg. 348-352, India.
31. Clinical and Laboratory Standars Institute®, (2004). “Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard”, Volumen 34, Número 2, USA.
32. Prabakaran M., (2011) “Invitro Antimicrobial Potencial of Marine *Oscillatoria* species”, en *Pelagia Research Library* [en línea], Número 1 (3), pg. 58-64, Asia.

ANEXOS

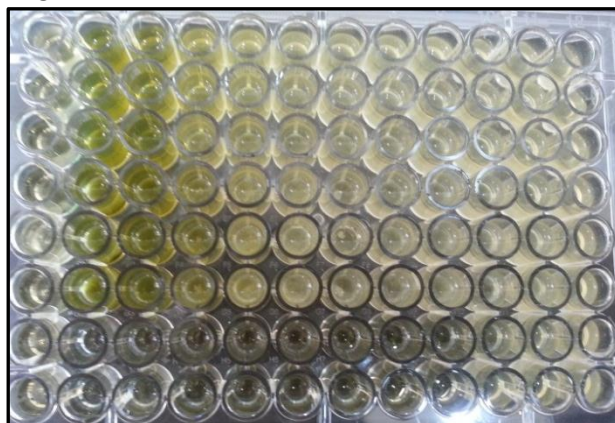
ANEXO 1: Cultivo de *Euglena viridis* en medio WC sólido y líquido.



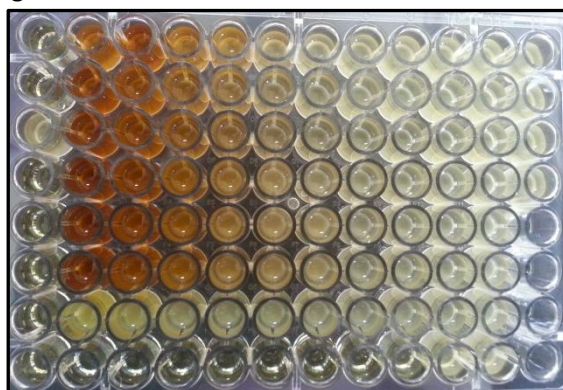
ANEXO 2: Cultivo de *Oscillatoria sp* en medio BG-11 sólido y líquido.



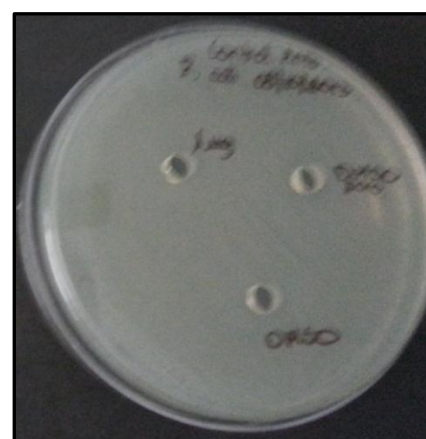
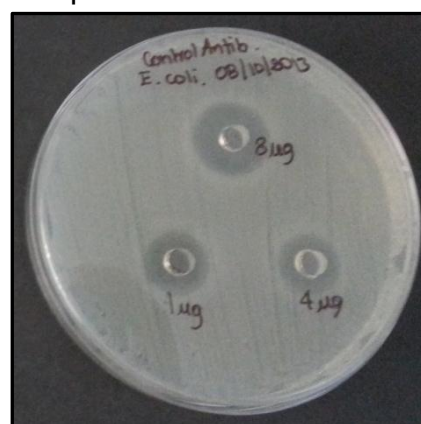
ANEXO 3: Screening del extracto metanólico sin clorofila de *Euglena viridis*.



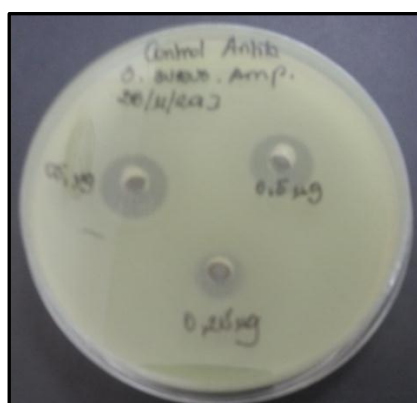
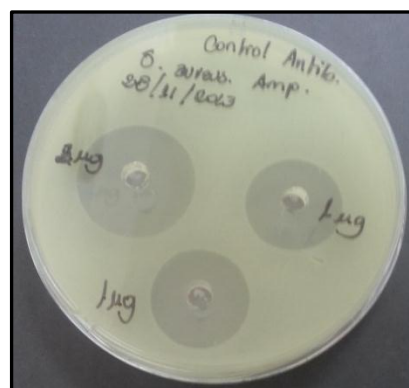
ANEXO 4: Screening de extracto metanólico sin clorofila de *Oscillatoria sp.*



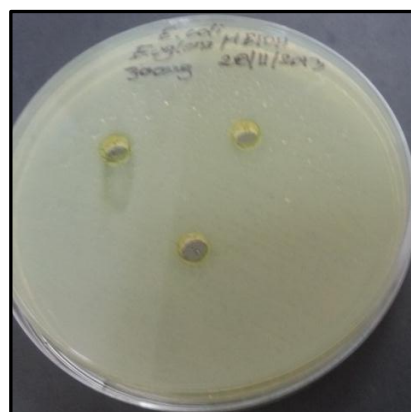
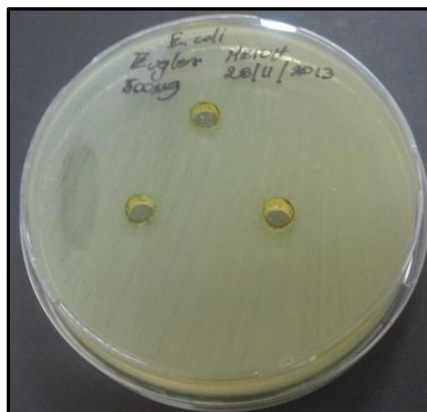
ANEXO 5: Control de Antibiótico (Ampicilina) y control de solvente por la técnica de Difusión en Agar Variante de Pocillo para *Escherichia coli*.



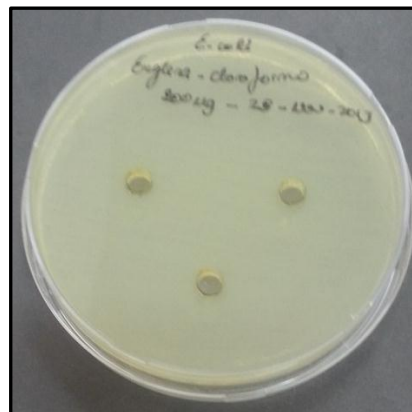
ANEXO 6: Control de Antibiótico (Ampicilina) y control de solvente por la técnica de Difusión en Agar Variante de Pocillo para *Staphylococcus aureus*.



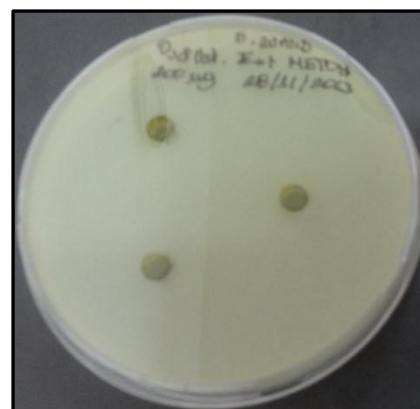
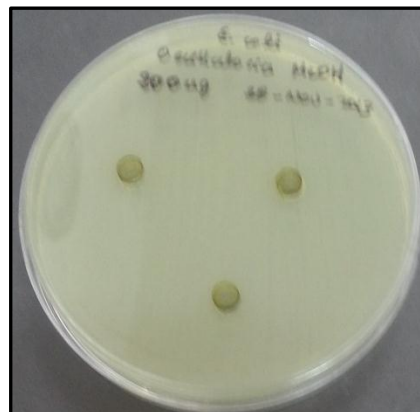
ANEXO 7: Screening del extracto metanólico de *Euglena viridis* a 500 y 300 μ g por la Técnica de Difusión en Agar Variante de Pocillo para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.



ANEXO 8: Screening del extracto clorofórmico de *Euglena viridis* a 500 y 200 μ g por la Técnica de Difusión en Agar Variante de Pocillo para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.



ANEXO 9: Screening del extracto metanólico de *Oscillatoria sp* a 500 y 200 ug por la Técnica de Difusión en Agar Variante de Poçillo para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.



ANEXO 10: Screening del extracto clorofórmico de *Oscillatoria* sp a 500 y 100 ug por la Técnica de Difusión en Agar Variante de Pocillo para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

