	GESTIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS Y BIBLIOTECARIOS		CÓDIGO	FO-GS-15	
			VERSIÓN	02	
	<b>ESQUEMA HOJA DE RESUMEN</b>			FECHA	03/04/2017
				PÁGINA	1 de 1
<b>ELABORÓ</b>		<b>REVISÓ</b>		<b>APROBÓ</b>	
Jefe División de Biblioteca		Equipo Operativo de Calidad		Líder de Calidad	

## RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR(ES): NOMBRES Y APELLIDOS COMPLETOS

NOMBRE(S): DAYANNA KARLAY APELLIDOS: ACELAS ZAPATA

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

DIRECTOR:

NOMBRE(S): ANDRES FERNANDO. APELLIDOS: BARAJAS SOLANO

TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE CIANOBACTERIAS TERMOTOLERANTES

Actualmente la resistencia antimicrobiana ha sido un tema de alto interés, la conservación de microorganismos y nuevos compuestos con actividad antimicrobiana contra cepas patógenas para el ser humano se ha convertido en un tema cada vez más importante. El objetivo de esta investigación se centró en a partir de muestras de biomasa y sobrenadante del cultivo de dos especies de cianobacterias Potamosiphon sp UFPS003 y una cianobacteria no determinada con código UFPS005 obtenidas de termales localizados en el departamento de Norte de Santander que se encuentran aisladas en el laboratorio INNOValgae de la Universidad Francisco de Paula Santander; recuperadas en la fase estacionaria, a las cuales se le realizaron varios tipos de extracciones con metanol, etanol, cloroformo.

PALABRAS CLAVES: cianobacterias, extractos, inhibición, antimicrobiana, resistencias.

PÁGINAS: 63

PLANOS: 0

ILUSTRACIONES: 0

CD ROOM: 0

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE  
CIANOBACTERIAS TERMOTOLERANTES

DAYANNA KARLAY ACELAS ZAPATA

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

CÚCUTA

2022

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE  
CIANOBACTERIAS TERMOTOLERANTES

DAYANNA KARLAY ACELAS ZAPATA

Proyecto de grado presentado como requisito para optar el título de

INGENIERO BIOTECNOLÓGICO

Director:

Biol, Ph.D. ANDRES FERNANDO BARAJAS SOLANO

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

CÚCUTA

2022

**ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO**

**FECHA:** 18 marzo de 2022

**HORA:** 10:00 A.M.

**LUGAR:** CUCUTA, NORTE DE SANTANDER – EVALUACION VIRTUAL

**PLAN DE ESTUDIOS:** INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

**TITULO: “EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE  
EXTRACTOS DE CIANOBACTERIAS TERMOTOLERANTES.”**

**MODALIDAD:** INVESTIGACIÓN

**JURADO:** LAURA YOLIMA MORENO ROZO  
PAOLA ANDREA ROMAN HERNANDEZ  
JUAN CARLOS RAMIREZ BERMUDEZ

**ENTIDAD:** UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER

**DIRECTOR:** ANDRÉS FERNANDO BARAJAS SOLANO

<b>NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE</b>	<b>CODIGO</b>	<b>CALIFICACION</b>
Dayanna Karlay Acelas Zapata	1611440	4.2

**OBSERVACIONES:** APROBADA.

**FIRMA DE LOS JURADOS**

*Laura Moreno Rozo*

*Paola Andrea Román Hernández*

*Juan Carlos Ramírez Bermúdez*

\_\_\_\_\_  
**Laura Yolima Moreno Rozo   Paola Andrea Román Hernández   Juan Carlos Ramírez Bermúdez**

*Jane A. Tenorio*

**Vo. Bo Coordinador Comité Curricular** \_\_\_\_\_

## Contenido

Resumen	10
Abstract	11
Introducción	12
1. Problema	15
1.1. Título	15
1.2. Planteamiento del problema	15
1.3. Formulación del problema	18
1.4. Justificación	18
1.5. Objetivos	20
1.5.1. Objetivo general	20
1.5.2. Objetivo específico	20
1.6. Alcance y limitaciones	21
1.6.1. Alcances	21
1.6.2. Limitaciones	21
1.7. Delimitaciones	22
1.7.1. Delimitación espacial	22
1.7.2. Delimitación temporal	22
2. Marco referencial	22
2.1. Antecedentes	22

2.2. Marco teórico	24
2.3. Marco contextual	29
2.4. Marco legal	29
3. Diseño metodológico	30
3.1. Tipo de investigación	36
3.2. Población y muestra	36
3.3. Hipotesis	37
3.4. Fases de la investigación	37
3.5. Instrumentos	38
3.6. Técnicas de recolección de datos	38
4. Resultados y análisis	38
4.1. Producción inicial de biomasa	38
4.2. Preparación y mantenimiento de <i>Escherichia coli</i>	40
4.3. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> .	42
4.4. Montaje en microplacas	44
4.5. Pruebas con resazurina	46
4.6. Cuantificación de ficocianinas	49
4.7. Comprobación de experimentos	51
Conclusiones	56
Bibliografía	57

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> <i>Clasificación del Phylum Cyanobacteria (División Cyanophyta).</i>	26
<b>Tabla 2.</b> <i>Componentes macro y micronutrientes del medio de cultivo BG11</i>	31

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> <i>Estructura de las cianobacterias.</i>	25
<b>Figura 2.</b> <i>Rutas biosintéticas para la formación de metabolitos en plantas.</i>	27
<b>Figura 3.</b> <i>Ecuaciones para identificar el contenido de ficocianinas y su pureza.</i>	33
<b>Figura 4.</b> <i>Producción inicial de biomasa en medio BG11.</i>	39
<b>Figura 5.</b> <i>Montaje E. coli en medio sólido.</i>	41
<b>Figura 6.</b> <i>E. coli enriquecida en agua peptonada.</i>	42
<b>Figura 7.</b> <i>Cinética de crecimiento del microorganismo patógeno de prueba.</i>	43
<b>Figura 8.</b> <i>Pozos iniciales (inoculación e interacción de la E. coli con la cianobacteria sin resazurina.</i>	45
<b>Figura 9.</b> <i>Resultados de las pruebas con la cepa UFPS 003.</i>	46
<b>Figura 10.</b> <i>Resultados de las pruebas con la cepa UFPS 005.</i>	47
<b>Figura 11.</b> <i>Contenido de ficobiliproteínas (%), obtenido a través de los diferentes métodos de extracción, de Oscillatoria sp, cultivada bajo condiciones controladas de laboratorio en fotobiorreactores.</i>	50
<b>Figura 12.</b> <i>Respuesta de E. coli a extractos de medio de cultivo (a), cloroformo (b), metanol (c), etanol (d).</i>	53
<b>Figura 13.</b> <i>continuación de la respuesta de E.coli a extractos de medio de cultivo, EPS (e), ficocianinas (f), y hexano (g).</i>	54



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por permitirme disfrutar de un proceso académico donde obtuve grandes conocimientos que a pesar de las dificultades logré sobresalir y seguir en pie luchando y mejorando, también quiero agradecer a mi familia por el apoyo incondicional, por ser el origen, la vida y la esperanza otorgada en este arduo proceso; seguidamente agradecer de manera especial y sincera al Biol, PhD. y guía profesional a ANDRÉS FERNANDO BARAJAS SOLANO, primeramente, por aceptarme realizar esta tesis bajo su dirección y por su paciencia, guía, tolerancia, tiempo dedicado; sobre todo por brindarme su lujoso conocimiento.

Seguidamente; Agradecerle al Ing. JEFFERSON EDUARDO CONTRERAS ROPERO por ser esa alma mater en el laboratorio con su paciencia y guía en los procesos y procedimientos, quien logro sobrellevar y guiarme de la mejor manera aun cuando las cosas parecían imposibles o muy complicadas, incluso cuando veía que ya no quedaban energías para continuar, mil gracias por ser más que una guía, un amigo quien supo comprender muchas situaciones y me apoyo en todos los aspectos para no desistir junto al Ing. NICOLAZ ALEJANDRO CARVAJAL ALBARRACIN por sus consejos y mejoras a nivel profesional siempre incondicional ante todas mis dudas y siempre un excelente amigo en quien apoyarse y confiar. Agradecer también a las demás personas que hicieron parte de todo este proceso como amigos, compañeros de la universidad y en especial mis compañeros de trabajo en el laboratorio INNOvalgae por tantas experiencias vividas y trabajando como equipo de una excelente manera, conocidos, profesores y personas que de una u otra manera aportaron un granito de arena en este proceso tan complejo, pero a su vez hicieron de esta una experiencia excepcional y única

## Resumen

Actualmente la resistencia antimicrobiana ha sido un tema de alto interés, la conservación de microorganismos y nuevos compuestos con actividad antimicrobiana contra cepas patógenas para el ser humano se ha convertido en un tema cada vez más importante. El objetivo de esta investigación se centró en a partir de muestras de biomasa y sobrenadante del cultivo de dos especies de cianobacterias *Potamosiphon* sp UFPS003 y una cianobacteria no determinada con código UFPS005 obtenidas de termales localizados en el departamento de Norte de Santander que se encuentran aisladas en el laboratorio INNOValgae de la Universidad Francisco de Paula Santander; recuperadas en la fase estacionaria, a las cuales se le realizaron varios tipos de extracciones con metanol, etanol, cloroformo, hexano, medio de cultivo, extracción de EPS y ficocianinas, en dichos extractos se evaluó la actividad antimicrobiana de cada una de las cianobacterias utilizando microplacas. La actividad antimicrobiana de los 2 extractos de cianobacterias en las 7 pruebas realizadas a cada una fue evaluada contra *E. coli*, utilizando 10 mg de extracto, 1 gramo perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro) y 10 mL del solvente dependiendo del que se usó en cada extracción. Los resultados mostraron un efecto antimicrobiano notorio en la prueba de extracción con cloroformo, así mismo se obtuvo una reducción parcial del crecimiento celular en las extracciones con metanol y etanol en algunas concentraciones específicas y no se evidenció actividad antimicrobiana en las demás extracciones. Todos los extractos fueron llevados a comprobación mediante un cultivo de medio agar nutritivo en caja Petri donde se compararon los resultados obtenidos.

**Palabras claves:** cianobacterias, extractos, inhibición, antimicrobiana, resistencias.

## Abstract

Currently antimicrobial resistance has been a topic of great interest, the conservation of microorganisms and new compounds with antimicrobial activity against pathogenic strains for humans has become an increasingly important issue. The objective of this research was focused on samples of biomass and culture supernatant of two species of cyanobacteria *Potamosiphon* sp UFPS003 and an undetermined cyanobacterium with code UFPS005 obtained from thermal springs located in the department of Norte de Santander that are isolated in the INNOValgae laboratory of the Francisco de Paula Santander University; recovered in the stationary phase, to which various types of extractions were carried out with methanol, ethanol, chloroform, hexane, culture medium, extraction of EPS and phycocyanins, in said extracts the antimicrobial activity of each of the cyanobacteria was evaluated using microplates. The antimicrobial activity of the 2 cyanobacterial extracts in the 7 tests carried out on each one was evaluated against *E. coli*, using 10 mg of extract, 1 gram of glass beads (0.5 mm in diameter) and 10 mL of the solvent depending on the that was used in each extraction. The results showed a notorious antimicrobial effect in the chloroform extraction test, likewise a partial reduction of cell growth was obtained in the extractions with methanol and ethanol in some specific concentrations and no antimicrobial activity was evidenced in the other extractions. All the extracts were verified by means of a culture of nutrient agar medium in a Petri dish where the results obtained were compared.

**Keywords:** cyanobacteria, extracts, inhibition, antimicrobial, resistance

## Introducción

La identificación de las aceleradas proliferaciones de las cianobacterias en grandes cantidades de diferentes cuerpos de aguas ha sido motivo de preocupación constante debido a que se detecta la presencia de metabolitos secundarios tóxicos o más conocidos como cianotoxinas. Dichas cianotoxinas son las toxinas producidas por las cianobacterias que pueden incluso ser mortales para la vida silvestre circundante, entre ellas se incluyen las neurotoxinas, hepatotoxinas y dermatotoxinas que son clasificadas de acuerdo a los órganos que afectan. Así como existen estos metabolitos también hay metabolitos secundarios no tóxicos que incluyen quelantes y compuestos absorbentes de UV (Haque, Banayan, Yee, & Chiang, 2017). Como también se incluyen fitohormonas y sideróforos que son secretados con una función específica y es la de adquirir la cantidad suficiente o necesaria para sus procesos fisiológicos.

Los metabolitos secundarios de las cianobacterias son la fuente potencial y provecho de una nueva clase de compuestos bioactivos de importancia farmacológica donde se incluyen lipopéptidos (lobociclámidas), péptidos lineales y cíclicos (lyngbyacyclámides A, B), depsipéptidos (homodolostatina), amidas de ácidos grasos (malingamidas), glicomacrólidos, porcinos. - holidas, viridamidas y macrolactonas. Dichos compuestos disponen de una gran cantidad de actividades biológicas, así como también de agentes antimicrobianos, antivirales, antiinflamatorios, antiprotozoarios, anticancerosos e inhibidores de proteinasas (Gogineni & Hamann, 2018). Por consiguiente, los exopolisacáridos (EPS) producidos por las cianobacterias se establecen entre los compuestos más importantes excretados por ellas debido a sus altas propiedades fisicoquímicas y actividad biológica presentada (Uhlířiková, Matulová, & Capek,

2020). Las cianobacterias representan una mayor actividad fotosintética, así como una alta tasa de crecimiento en comparación a las demás especies vegetales. Por lo tanto, son consideradas como una materia prima altamente potencial para producción de biocombustibles de tercera generación y muchos más productos valiosos de interés industrial o comercial (Chen, Yeh, Aisyah, Lee, & Chang, 2011). Los exopolisacáridos de las cianobacterias poseen cantidades enriquecidas de ácidos urónicos y grupos sulfato en su superficie, esta característica ofrece una naturaleza pegajosa de carga aniónica a estos polisacáridos que no se reportan en organismos procariotas (Tiwari, y otros, 2020). Debido a las propiedades reológicas y antioxidantes que presentan el EPS extraído de las cianobacterias es ampliamente utilizado en la industria de alimentos, en el área farmacológica y de cosmética (Kumar, Kastanek, & Adhikary, 2018). Los polisacáridos ejercen funciones específicas fundamentales al interior de las células, incluyendo el incremento y desarrollo estructural de diversas actividades funcionales (Delattre, Guillaume, Céline, & Michaud, 2016).

Alrededor del 40% de los compuestos característicos y estudiados de las cianobacterias tienen potentes actividades antimicrobianas y anticancerígenas y, por ello, son provechosas como posible agente terapéutico (Jaspars & Lawton, 1998). Para el desarrollo e innovación de antibióticos, la ciencia científica está realizando experimentos con diferentes especies de cianobacterias para determinar cuál es su actividad antimicrobiana y que tanta se encuentra potencialmente activa para atacar a microorganismos patógenos. Hasta el momento, no existe un amplio espectro de todos los compuestos encontrados, sino que han sido pocos los que se han caracterizado como Noscomin de *Nostoc commune*, pahayokolide A de *Lyngbya sp.*, ácidos grasos de *Oscillatoria redeki* HUB051 mostró actividad antibacteriana contra *B. subtilis* SBUG

14, *Micrococcus flavus* SBUG 16, *S. aureus* SBUG 11, *S. aureus* ATCC 25923 comparable a la de los medicamentos estándar (Mundt, Mell, & Roeske, 2003). Por eso los efectos de los antibióticos y otro tipo de fármacos sacados de cianobacterias se basan de diversas formas y los géneros más mayor grado de estudio que se han venido tratando incluyen *Microcystis* sp., *Oscillatoria* sp., *Anabaena variabilis*, y *A. circinalis* (Marrez, Sultan, & Elabbas Embaby, 2017); (Abdel-Raouf, 2008).

## **1. Problema**

### **1.1. Título**

Evaluación de la capacidad antimicrobiana de extractos de cianobacterias termotolerantes.

### **1.2. Planteamiento del problema**

El manejo indiscriminado de los antibióticos o medicamentos comerciales creados con el fin de combatir ciertos rasgos genéticos de muchos microorganismos que alteran algunos hábitats ha provocado que su actividad se vea reducida o a veces incapaz por la resistencia de los microorganismos causantes de las diversas patologías presentes sobre todo en ambientes hospitalarios (Jimenez velasquez, y otros, 2020). Dicha resistencia que adquieren es causada debido a que han sido muy capaces de desarrollar defensas más efectivas contra los antibióticos comerciales que se han suministrado para su control de extinción (Alvarez Martins, Gimenez Perez, Reynaga, Carabias, & Deltell, 2020). El problema radica cuando una bacteria o microorganismo resistente a uno o varios antibióticos es expuesta a otro medicamento, debido a que crea la oportunidad de generar una mutación que resiste al nuevo antibiótico (Oteo Iglesias, 2019). Aun así se hace necesario continuar la búsqueda para identificar otros tipos de microorganismos que presentan actividad antimicrobiana como se pretende investigar en este apartado con un modelo de cianobacteria como lo es *Oscillatoria* sp y reconocer qué tipo de capacidad antimicrobiana puede combatir contra alguna especie de patógeno en específico o una

gama de especies en general, de esta manera dando un aporte a la industria comercial y al banco de cepas específicamente distinguida como una cepa ya establecida e inhibitoria de microorganismos (Wang, y otros, 2020). A causa de la carencia de antibióticos eficaces y poco suficientes en la humanidad, la bioprospección ha sido un estudio que ha tomado una amplia fuerza a nivel de investigación en los últimos años debido a que ha abarcado microorganismos fotosintéticos como microalgas y cianobacterias que son microorganismos muy prometedores y de buen provecho biológico debido a sus propiedades antimicrobianas en general que han demostrado tras estudios los metabolitos que los componen (Mi, Zhang, He, & Yan, 2017). Varias de las capacidades antimicrobianas de las algas y cianobacterias se han enlazado con los ácidos grasos insaturados y entre este primer compuesto antimicrobiano de ese tipo tenemos la clorelina aislada de *Clorella* sp. siendo una mezcla de ácidos grasos que inhiben el crecimiento de bacterias grampositivas y gramnegativas (Alsenani, y otros, 2020). Dentro de la investigación de compuestos antimicrobianos obtenidos a partir de microalgas y exopolisacáridos de cianobacterias muchos de estos compuestos han sido reconocidos como clorelina, noscomina, diterpenoides, pahayokolido, entre otros (Bhunja, y otros, 2018). A Partir del año 2006 hasta finales del 2016, se han descubierto aproximadamente 126 nuevos péptidos a partir de cianobacterias marinas pertenecientes a los géneros: *Lyngbya* spp., *Oscillatoria* spp., *Moorea* spp. y *Symploca* spp. (Mi, Zhang, He, & Yan, 2017) microorganismos que inhiben a muchos parásitos como: *Plasmodium* spp., *Trypanosoma* spp. y *Leishmania* spp. (Mi, Zhang, He, & Yan, 2017). Mientras que algunas microalgas características como *Chlorella stigmatophora*, *Microcystis aeruginosa* y *Chlorella* spp. poseen un gran número y beneficio de actividades antimicrobianas frente a diferentes bacterias como *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *B. subtilis* (Mena Aguirre, 2020).



Dentro de lo planteado para detectar si se cumple necesariamente con esta capacidad o de lo contrario no es posible en cianobacterias termotolerantes se declaran muchos modelos de métodos que permiten realizar esta identificación como lo son las técnicas de antibiograma de rutina que se basan en un estudio fenotípico donde se observa el crecimiento microbiano en presencia de diferentes antibióticos suministrados, siendo muy rápidas dando el resultado alrededor de las 17h como también se han comercializado varios kits para detectar carbapenemasas, como el RAPIDEC. ® Kit CARBA NP (bioMérieux) y la pantalla Rapid CARB ® kit (Rosco Diagnostica A / S). Estos kits rinden resultados en unas 2 h con una sensibilidad y una especificidad muy cercanas al 100% En dichas pruebas, la bacteria es incubada en presencia del antibiótico. Si esta posee una carbapenemasa, el antibiótico se hidroliza y hay un cambio en el pH del medio que se detecta a través de un cambio en el color del indicador. La resazurina, añadida a una suspensión bacteriana resistente al antibiótico con el que se incuba, es reducida por la actividad metabólica de la bacteria y si esta es sensible al antibiótico, su metabolismo se detiene y, en consecuencia, permanece en su forma oxidada, Dado que la forma reducida de resazurina es estable y de color rojo, y fotométricamente distinguible gracias al indicador torna a un color azul (March-Rossello, 2017). Se hace necesario a partir de lo expresado anteriormente, generar ideas, estrategias de investigación, generación e innovación que permitan adquirir nuevos conocimientos sobre los metabolitos de microorganismos fotosintéticos como en este caso las cianobacterias termotolerantes y si estos poseen actividad inhibitoria de crecimiento de cepas patógenicas de bacterias y a su vez si con el método de resazurina se puede realizar la identificación y validación de la capacidad antimicrobiana que se quiere detectar o en caso contrario no resulta como método eficaz en cepas termotolerantes de cianobacterias como *Oscillatoria* sp.

### **1.3. Formulación del problema**

¿Los extractos de cianobacterias termotolerantes previamente aisladas de termales del departamento de Norte de Santander poseen capacidad antimicrobiana?

### **1.4. Justificación**

La búsqueda de nuevos compuestos producto de microorganismos con actividad antimicrobiana es una tarea urgente que requiere ejecutarse a gran escala. Es importante realizar este tipo de investigaciones ya que hasta el momento solo se tiene un conjunto limitado de agentes microbianos, es decir, sustancias fabricadas industrialmente capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos como bacterias, hongos o protozoos. A su vez, es común encontrar distintas maneras de dosificar y combinar estos compuestos para incrementar su eficiencia, disminuir la resistencia y/o daño causado, paralelamente con la búsqueda y rápido desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, pero esto al pasar los años trae sus consecuencias graves como la resistencia de muchos microorganismos patógenos que ya en todo su tiempo de viabilidad han soportado y tomado trazas de cada uno de estos compuestos mezclados para fortalecerse y eso es lo que genera grandes problemáticas, por ello es óptimo tener nuevos estudios para microorganismos en específicos y no dar paso a dichas combinaciones que solo llevan a que los patógenos creen mutaciones. La resistencia microbiana a los antibióticos es una amenaza persistente y continua a la salud pública a una gran escala global que se ha venido incrementando al pasar de los años y está asociada con niveles altos de morbilidad y mortalidad (Frieri, Kumar, & Boutin, 2017). Dicha

capacidad de equilibrar el efecto de uno o más agentes antimicrobianos es el resultado de la selección natural y de la transferencia tanto vertical como horizontal de genes de resistencia (Sprigg & Pietrangeli, 2019). Los procesos evolutivos subyacentes a dicha selección favorecen las mutaciones que generan nuevas resistencias a ciertos antibióticos y mutaciones compensatorias, que conforman el costo en adecuación biológica necesario para mantener allí la resistencia dentro de una población microbiana (Collins & Brown Eric, 2019). Para ello también el uso de la resazurina como método es importante ya que cumple la función de indicar cuál es la cantidad mínima de antimicrobiano que puede tener la capacidad de impedir el crecimiento de microorganismos en unas condiciones normalizadas, estimando las células viables de color rosa y las no viables tornandolas de un color azul. El color rosa que emiten estas células es debido a que la resazurina es reducida a resofurina por las oxidoreductasas que son encontradas principalmente en las mitocondrias (Castañeda Matute, 2019). Otra de las ventajas que ofrecen estos microorganismos es que permiten y dan un apoyo para el trabajo que se realiza en el área de la bioprospección y es que su cultivo o propagación a grandes escalas resulta ser una práctica muy rentable en la industria, pues debido a que estos microorganismos tienen unos requerimientos nutricionales simples y sencillos que no complican la operación y sobre todo que ellos mismos no necesitan condiciones especiales medioambientales ya que emplean la luz natural para la fotosíntesis (Mena Aguirre, 2020).

## **1.5.Objetivos**

### **1.5.1. Objetivo general**

Evaluar el potencial antimicrobiano de extractos de cianobacterias termotolerantes

### **1.5.2. Objetivo específico**

Determinar la actividad antimicrobiana y el efecto de la concentración de EPS de 2 cianobacterias (UFPS 003 y UFPS 005) contra E. coli para conocer si hay posibilidad o no de mejorar la capacidad con estos.

Identificar el efecto de la concentración de extractos lipídicos de 2 cianobacterias (UFPS 003 y UFPS 005) en la actividad antimicrobiana en E. coli

Cuantificar el efecto de la concentración de extractos proteicos de 2 cianobacterias (UFPS 003 y UFPS 005) en la actividad antimicrobiana en E. coli.

## **1.6. Alcance y limitaciones**

### **1.6.1. Alcances**

Con este proyecto se pretende determinar cuáles son las cepas que tienen actividad antimicrobiana y si se puede mejorar esta capacidad con los EPS o de algún extracto. Se espera que el presente proyecto contribuya al desarrollo y establecimiento de cepas de cianobacterias con capacidad antimicrobiana con el fin de inhibir ciertos microorganismos patógenos de una forma eficaz y más económica a escala industrial.

### **1.6.2. Limitaciones**

La presencia de condiciones no favorables como daños o pérdidas de material microbiano, reactivos o materia prima y equipos de trabajo presentes en el laboratorio así como también diversos tipos de contaminaciones medioambientales u operacionales que dificulta la ejecución del proyecto y la evaluación antimicrobiana de las cianobacterias termotolerantes; y finalmente una limitación muy usual en este tipo de proyectos es la demora en la compra de reactivos y equipos que se requieren para la ejecución o su elevado costo económico que genera cierto tipo de obstáculo en la continuidad satisfactoria.

## **1.7.Delimitaciones**

### **1.7.1. Delimitación espacial**

Este proyecto se llevará a cabo en los laboratorios de calidad ambiental, de la Universidad Francisco De Paula Santander, Sede Campos Elíseos.

### **1.7.2. Delimitación temporal**

El presente trabajo de investigación tendrá una duración aproximada de 12 meses después de su aprobación.

## **2. Marco referencial**

### **2.1.Antecedentes**

Las cualidades medicinales de las cianobacterias han sido apreciadas desde el año 1500 A.C. en donde las especies de *Nostoc* sp fueron utilizadas para tratar la gota, la fístula y varias formas de cáncer (Metting & Pyne, 1986). Sin embargo, antes de la década de 1990 se llevaron a cabo investigaciones limitadas en el aislamiento de productos naturales biológicamente activos a partir de cianobacterias. Dichos compuestos son eficaces contra bacterias Gram-positivas y/o

Gram-negativas. Cepas de cianobacterias tóxicas y no tóxicas son productoras de compuestos antibacterianos, diferentes a las cianotoxinas. (Sanchez Sebastian, 2018) en su trabajo de investigación titulado "Evaluación fitoquímica y capacidad antioxidante in vitro de extracto etanólico de *Nostoc* sp. Identifica los metabolitos secundarios como triterpenos y esteroides (prueba de Lieberman-Burchard), saponinas (prueba de espuma), compuestos fenólicos (prueba de cloruro férrico), flavonoides fueron demostrados por análisis fitoquímicos. Prueba de Shinoda) y antocianidinas (prueba de antocianidina). Asimismo, determinaron la concentración de compuestos fenólicos por el método Folin-Ciocalteu, exhibiendo  $2,562 \pm 0.051$  mg de ácido gálico equivalente (EAG) por gramo de muestra seca. De igual manera (Flores Melo, De la Rosa, Wenzel, & Diaz, 2019), en su estudio titulado "Cianobacterias acidotermófilas del Complejo Termal Copahue, Neuquen, Argentina", presentan descripciones de especies identificadas que pertenecen a nueve géneros en los cuales están: *Chroococcidiopsis* sp., *Chroococcus* sp., *Kamptomena* sp., *Komvophoron* sp., *Leptolyngbya* sp., *Mastigocladus* sp., *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp. y *Spirulina* sp. recolectadas en diez sitios de muestreo. Cinco especies: *Chroococcus membraninus*, *Chroococcidiopsis thermalis*, *Spirulina gracilis*, *Phormidium thermobium* y *Komvophoron jovis*, las cuales son citadas por primera vez en Argentina. En la laguna Los Callos fue donde más se registraron especies de cianobacterias y todas estas que fueron estudiadas las utilizaron ya sea mediante la aplicación directa de las natas o por la utilización de sus componentes activos, en las aguas y en los fangos. Por último, (Trabelsi, Mnari, Abdel-Daim, Abid-Essafi, & Lotfi, 2016), realizaron una investigación titulada "Propiedades terapéuticas en las aguas termales de Túnez: primera evidencia de compuestos fenólicos en la cianobacteria *Leptolyngbya* sp. biomasa, polisacáridos capsulares y polisacáridos liberadores". El principal objetivo de estudio fue investigar el potencial antioxidante de la cianobacteria termófila *Leptolyngbya* sp. y determinar sus componentes fitoquímicos y su perfil fenólico. Según el

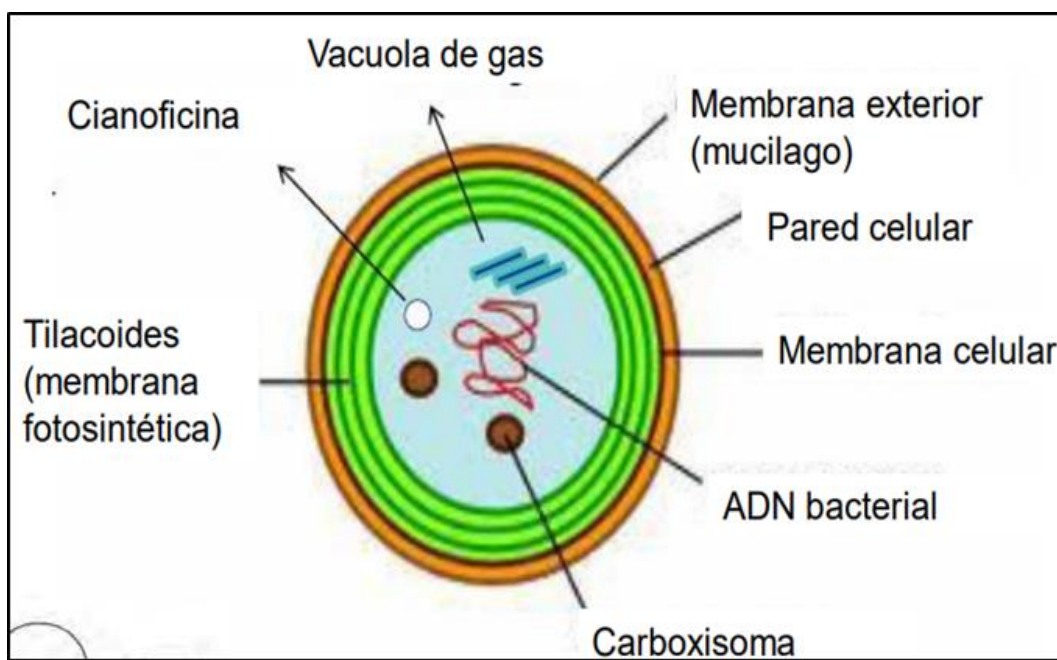
método que emplearon fue el extracto Metanólico de Biomosas teniendo en cuenta que estas cianobacterias contienen gran cantidad de fenoles ( $139 \pm 1.2$  mg/g), flavonoides ( $34.9 \pm 0.32$  mg CEQ/g), carotenoides ( $2.03 \pm 0.56$  mg/g) y vitamina C ( $15.7 \pm 1.55$  mg/g). De acuerdo a estos análisis demostraron que la cianobacteria *Leptolyngbya* sp. posee abundantes productos antioxidantes naturales que pueden tener efectos profilácticos y terapéuticos sobre muchos tipos de enfermedades.

## **2.2.Marco teórico**

Las cianobacterias son una fuente altamente potencial de péptidos y productos naturales integrados de tipo péptido-policétido que tienen una capacidad inherente que se podría convertir en una fuente prometedora de agentes terapéuticos antimicrobianos y antioxidantes (Nainangu, Matharasi Antonyraj, Subramanian, Kaliyaperumal, & Gopal, 2020). Las cianobacterias habitan rodeadas de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) las cuales juegan un papel importante en procesos como la retención de agua, agregación de células bacterianas, formación de puentes entre las células, los depósitos de nutrientes y la protección contra los antimicrobianos (Strieth, y otros, 2020). Ciertas condiciones ambientales presentes como los son la acumulación de residuos orgánicos o aumentos de temperatura favorecer un crecimiento elevado de las cianobacterias abriendo una cadena de proliferaciones masiva o también se le puede llamar floración lo que ayuda a la modificación del agua. Estos microorganismos son característicos por su relación con la fotosíntesis y emisión de oxígeno ya que contienen una forma de clorofila “a” y poseen pigmentos biliprotéicos como las ficobilinas que ejercen una función como pigmento accesorio del proceso de la fotosíntesis. Poseen características específicas como: la presenta de ácidos grasos con dos o



más enlaces dobles en la cadena hidrocarbonada a diferencia de todas las demás procariotas que poseen ácidos grasos saturados, contienen vesículas de gas en su citoplasma que se encargan de mantener en flotación a las cianobacterias para que de este modo logren ubicarse en la zona de máxima iluminación, son capaces de retener gases y nitrógeno gracias a las estructuras que presentan (Figura 1).



**Figura 1.** Estructura de las cianobacterias.

**Fuente:** Tomado de parra & Almanza, 2014.

En el siglo XIX se creó un sistema taxonómico en donde a las cianobacterias fueron consideradas parte de la flora y de los organismos vegetales; de esta forma se les clasifica según sus características morfológicas, para la creación de manuales detallados y completos que

incluyen más de 2000 especies diferentes. En la tabla 1 se presenta un resumen de los órdenes, familias y algunos géneros del phylum cianobacteria, de acuerdo a la clasificación presentada por el National Center of Biotechnology Information (NCBI).

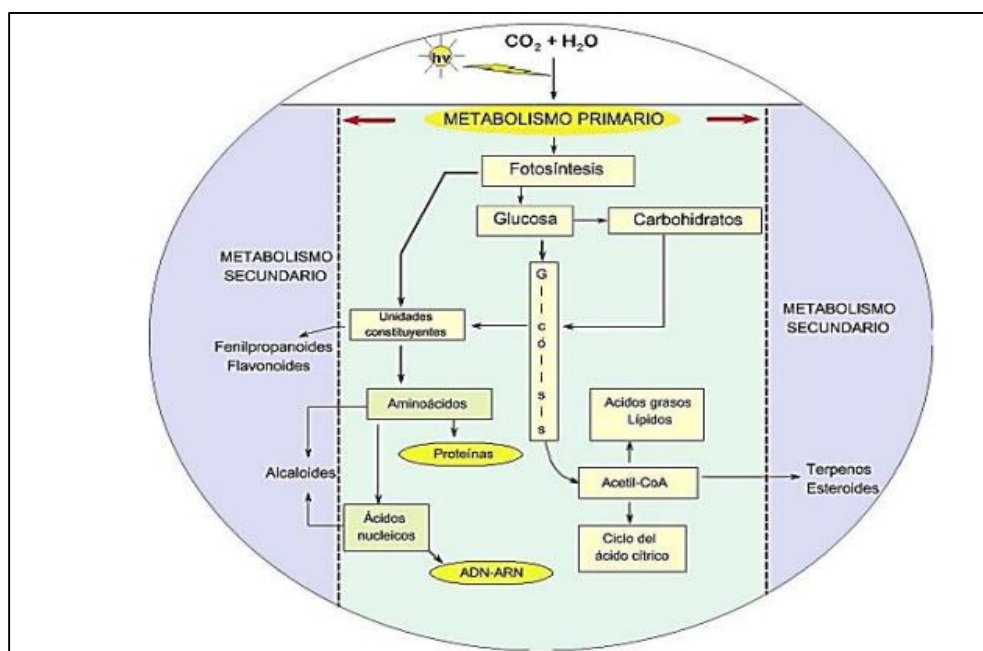
**Tabla 1.** Clasificación del Phylum Cyanobacteria (División Cyanophyta).

ORDEN/FAMILIA	GENERO
Chroococcales	<i>Chroococcus</i> , <i>Gloeothece</i> , <i>Halothece</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Synechococcus</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Merispormedia</i> .
Nostocales	
Nostocaceae	
Rivulariaceae	<i>Anabaena</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Nostoc</i> .
Seytonemataceae	<i>Calothrix</i> , <i>Gloetrichia</i> .
Oscillatoriales	<i>Oscillatoria</i> , <i>Pseudoanabaena</i> , <i>Spirulina</i>
Pleurocapsales	<i>Chroococidiopsis</i> , <i>Dermocapsa</i>
Stigonematale	<i>Chlorogloeopsis</i> , <i>Fischerella</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Mastigocladus</i> , <i>Umezakia</i>

**Fuente:** Premazzi y Volterra, 1993; Skulberg et al., 1993; Carpenter y Carmichael, 1993.

Estas poseen unos metabolitos secundarios que son aquellos compuestos químicos derivados del metabolismo primario de las plantas, estos cumplen diferentes funciones que no son

indispensables en ellas, pero cumplen una función y es la de protegerlas de depredadores herbívoros, bacterias, hongos y virus (Frassanito, Cantonati, Tardio, Mancini, & Guella, 2005). Estos son compuestos indispensables como principios activos en la elaboración de fármacos o fitofármacos. Según (Ochoa Amado & Sarmiento Mora, 2018); nos refiere que “existen alrededor de 170.000 metabolitos de origen vegetal, lo que recomienda el estudio de nuevas especies vegetales para contribuir en la investigación de nuevos compuestos”.



**Figura 2.** Rutas biosintéticas para la formación de metabolitos en plantas.

**Fuente:** Tomado de Toledo, M. 2015.

Las cianobacterias son microorganismos con capacidades antibióticas, antimicrobiana y anticancerígenas; algunas de ellas contienen proteínas como la cyanovirina-N, la cual está en el desarrollo de una investigación debido su aplicación como agente antiviral muestra actividad contra el VIH (Ministerio de la Salud de la Argentina, 2013). Las especies de mayor importancia

que se han identificado son: *Spirulina* sp., *Oscillatoria* sp., *Anabaena* sp., y *Microcystis* sp., debido a que poseen un alto porcentaje de proteínas. Además, son utilizadas en la elaboración de cremas anti edad, para la reparación y generación de una nueva piel (capacidad de estimular la producción de colágeno); como emolientes y para la irritación (Solano, 2017). Este incremento acelerado de la resistencia antibiótica en cepas de *E. coli* a diversos antibióticos se debe principalmente a la resistencia adquirida, en la que se transfieren genes de resistencia mediante plásmidos, entre diferentes especies. Este mecanismo les permite incrementar su supervivencia a los diferentes tratamientos terapéuticos actuales contra este microorganismo, dificultando el control y tratamiento de las patologías causadas por esta bacteria (Sanchez Sebastian, 2018).

En la industria química según Solano J (2017); afirma que se usan para la “elaboración de vitaminas, de colorantes naturales para alimentos de animales y de humanos por sus pigmentos como: betacaroteno, luteína, fitol, aminoácidos, polisacáridos, glicerol, enzimas, fosfolípidos, ácidos grasos esenciales y prostaglandinas”. Muchos géneros de cianobacterias poseen un alto potencial antitumoral, con una buena fuente de vitaminas, por ejemplo 20 g de *Spirulina* aportan toda la vitamina B12 requerida en un día, así como el 70% de B1 (tiamina), el 50% de B2 (riboflavina) y el 12% de B3 (niacina). Además, la *Spirulina* sp. es rica en tocoferol (vitamina E); lo cual se considera a esta especie de gran importancia para la salud de la población.

### **2.3.Marco contextual**

El trabajo se desarrollará en la Sede de Campos Elíseos de la Universidad Francisco de Paula Santander, en el segundo piso de los laboratorios de calidad ambiental en el laboratorio de INNOV*algae*.

### **2.4.Marco legal**

DECRETO 1575 DE 2007: El objeto del presente decreto es establecer el sistema para la protección y control de la calidad del agua, con el fin de monitorear, prevenir y controlar los riesgos para la salud humana causados por su consumo, exceptuando el agua envasada. Aplica a todas las personas prestadoras que suministren o distribuyan agua para consumo humano, ya sea cruda o tratada, en todo el territorio nacional, independientemente del uso que de ella se haga para otras actividades económicas, a las direcciones territoriales de salud, autoridades ambientales y sanitarias y a los usuarios.

LEY. 9 de 1979: Código Sanitario Nacional por cuanto dicta medidas sobre las condiciones sanitarias básicas para la protección en el medio ambiente, suministro de agua, saneamiento de edificaciones, alimentos, droga, medicamentos, cosméticos, vigilancia y control epidemiológico, prevención y control de desastres, derechos de los habitantes respecto a la salud.

Ley 0029 de 1990: Por la cual se dictan las disposiciones para el fomento de la investigación científica y el desarrollo tecnológico y se otorgan facultades extraordinarias.

### 3. Diseño metodológico

- **Microorganismo**

Dos cianobacterias termotolerantes (UFPS003 y UFPS005) fueron tomadas de termales localizados en el departamento de Norte de Santander. Las cepas se encuentran ya aisladas y caracterizadas en el laboratorio INNOValgae de la Universidad Francisco de Paula Santander en medio BG11 sólido a  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y una temperatura de  $27^\circ\text{C}$ . Para su conservación una vez cada 35 días las cepas fueron reinoculadas en tubos de 10 mL con 4 mL de medio BG11 sólido fresco.

- **Produccion inicial de biomasa**

Las cepas se cultivaron en medio BG11 (Tabla 1) (Andersen et al., 2005) en reactores de 500 mL con un volumen de trabajo de 300 mL. El medio se agito mediante la inyección de aire a un flujo de aproximadamente  $180 \text{ mL}_{\text{aire}}/\text{min}$ . y una radiación constante de  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

**Tabla 2.** Componentes macro y micronutrientes del medio de cultivo BG11

Componente	Solución stock (g*L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O)	Cantidad utilizada	Concentración final en el medio (M)
Ácido cítrico	6	1 ml	3.12 X 10 <sup>-5</sup>
Amonio citrato férrico	6	1 mL	3 X 10 <sup>-5</sup>
NaNO <sub>3</sub>	--	1.5 g	1.76 X10 <sup>-2</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40	1 mL	1.75 X 10 <sup>-4</sup>
MgSO <sub>4</sub>	75	1 mL	3.04 X 10 <sup>-4</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	36	1 mL	2.45 X 10 <sup>-4</sup>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20	1 mL	1.89 X 10 <sup>-4</sup>
MgNa2EDTA	1	1 mL	2.79 X 10 <sup>-6</sup>
Solución de metales		1 mL	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	--	2.86 g	4.63 X 10 <sup>-5</sup>
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	--	1.81 g	9.15 X 10 <sup>-6</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	--	0.22 g	7.65 X 10 <sup>-7</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	79	1 mL	3.16 X 10 <sup>-7</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	--	0.93 g	1.61 X 10 <sup>-6</sup>
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	49.9	1 mL	1.70 X 10 <sup>-7</sup>

Fuente: Andersen et al., 2005.

- **Preparación de biomasa previa a extracción de metabolitos**

Un reactor con 20 días de cultivo se retiró de la aireación y se decantó (2 horas), el exceso de agua se retiró y la biomasa se centrifugo (3400 rpm, 20 min). La biomasa fue secada en moldes siliconados de grado alimentario a 50°C durante 24 horas. La biomasa recuperada se usó para los procesos de extracción.

- **Extracción de EPS**

300 mL de medio sin células se mezcló con 900 mL de etanol al 96% y se dejó reposar durante 24 horas a 4°C. El volumen total se centrifugo a 4500 rpm (20°C) durante 20 minutos. El precipitado (EPS) se concentró y se secó a 40°C durante 24 horas. Este extracto se usó en las pruebas antimicrobianas (Jain, Tharanathan, & Bhosle, 2005).

- **Extracción de ficocianinas**

10 mg de biomasa seca se mezcló con aproximadamente 1 gramo perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro) y 10 mL de buffer fosfato (0,05M, pH 6.8) en oscuridad, luego se llevó a vortex por 15 minutos a velocidad máxima. Los tubos se mantuvieron en nevera a 4°C durante 24 horas. Finalizado el tiempo, la muestra se centrifugo a 3400 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante de color azul se empleó para determinar el contenido de ficocianinas y su pureza de acuerdo con las



ecuaciones en la figura (3) descrita por Bennett Y Bogorad (1973). Este extracto se usó en las pruebas antimicrobianas.

$$C - PC(g/L) = \frac{OD_{620} - 0.474(OD_{652})}{5.34} \quad (1)$$

$$APC(g/L) = \frac{OD_{652} - 0.208(OD_{620})}{5.09} \quad (2)$$

$$PE(g/L) = \frac{(OD_{562} - 2.41(P - PC) - 0.849(APC))}{9.62} \quad (3)$$

**Figura 3.** Ecuaciones para identificar el contenido de ficocianinas y su pureza.

**Fuente:** Bennett & Bogorad. 1973.

- **Extracción de productos metanólicos**

10 mg de biomasa seca se mezcló con aproximadamente 1 gramo perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro) y 10 mL de metanol en oscuridad, luego se llevó a vortex por 15 minutos a velocidad máxima. Los tubos se mantuvieron en nevera a 4°C durante 24 horas (Moheimani, Borowitzka, Ispepsky, & Fon Sing, 2013). Finalizado el tiempo, la muestra se centrifugo 3400 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se recolecto y fue reducido por rotoevaporación (40°C). Este extracto se usó en las pruebas antimicrobianas.

- **Extracción de productos etanólicos**

10 mg de biomasa seca se mezcló con aproximadamente 1 gramo perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro) y 10 mL de etanol en oscuridad, luego se llevó a vortex por 15 minutos a velocidad máxima. Los tubos se mantuvieron en nevera a 4°C durante 24 horas (Moheimani, Borowitzka, Ispepsky, & Fon Sing, 2013) Finalizado el tiempo, la muestra se centrifugo 3400 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se recolecto y fue reducido por rotoevaporación (40°C). Este extracto se usó en las pruebas antimicrobianas.

- **Extracción de productos solubles en cloroformo**

10 mg de biomasa seca se mezcló con aproximadamente 1 gramo perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro) y 10 mL de cloroformo en oscuridad, luego se llevó a vortex por 15 minutos a velocidad máxima. Los tubos se mantuvieron en nevera a 4°C durante 24 horas (Moheimani, Borowitzka, Ispepsky, & Fon Sing, 2013). Finalizado el tiempo, la muestra se centrifugo 3400 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se recolecto y fue reducido por rotoevaporación (40°C). Este extracto se usó en las pruebas antimicrobianas.

- **Extracción de productos solubles en hexano**

10 mg de biomasa seca se mezcló con aproximadamente 1 gramo perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro) y 10 mL de hexano en oscuridad, luego se llevó a vortex por 15 minutos a

velocidad máxima. Los tubos se mantuvieron en nevera a 4°C durante 24 horas (Moheimani, Borowitzka, Ispepsky, & Fon Sing, 2013). Finalizado el tiempo, la muestra se centrifugo 3400 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se recolecto y fue reducido por rotoevaporación (40°C). Este extracto se usó en las pruebas antimicrobianas.

- **Determinación actividad antimicrobiana de extractos**

La cepa de *E. coli* fue traída de la Universidad de Pamplona ya aislada y caracterizada específicamente comprobando su pureza; La actividad antimicrobiana de cada uno de los extractos se realizó empleando la metodología propuesta por (Strieth, y otros, 2020). *E. coli* se cultivó en medio E.M.B. (eosina y azul de metileno) tienen 2 a 4 mm de diámetro, un centro grande de color oscuro e incluso negro, y tienen brillo verde metálico cuando se observan con luz reflejada; durante 24 horas. Después del tiempo de cultivo se diluyo la concentración hasta alcanzar una densidad óptica de  $1 \pm 0.02$  (600 nm). 50 uL de cultivo se mezcló con 50 uL de los diferentes extractos y se incubaron durante 14 horas a 30°C y 100 rpm. Finalizado el tiempo de incubación se adicionaron 10uL de resarzurina (0.2 mg/L). Los experimentos que den coloración azul serán positivos para actividad antimicrobiana. Como control se evaluaron los solventes empleados y el medio de cultivo. Cada uno de los experimentos se realizará con 5 réplicas para un total de 6 datos por experimento.

### **3.1. Tipo de investigación**

El trabajo será en modalidad de investigación de tipo explicativo por método experimental, ya que se manipula una o más variables de estudio, para controlar el aumento o disminución de esas variables y su efecto en las conductas observadas. Dicho de otra forma, un experimento consiste en hacer un cambio en el valor de una variable (variable independiente) y observar su efecto en otra variable (variable dependiente). Esto se lleva a cabo en condiciones rigurosamente controladas, con el fin de describir de qué modo o por qué causa se produce una situación o acontecimiento particular.

Según (Gilaberte & Gonzalez, 2010 Actas Dermo-Sifiliográficas) La investigación experimental consiste en la manipulación de una (o más) variable experimental no comprobada, en condiciones rigurosamente controladas, con el fin de describir de qué modo o por qué causa se produce una situación o acontecimiento particular. El experimento provocado por el investigador, le permite introducir determinadas variables de estudio manipuladas por él, para controlar el aumento o disminución de esas variables y su efecto en las conductas observadas.

### **3.2. Población y muestra**

Se empleará las cepas UFPS003 y UFPS005 aisladas de un termal del departamento del Norte de Santander.

### **3.3.Hipotesis**

A partir de las cepas aisladas de cianobacterias es posible que algún extracto contenga actividad antimicrobiana contra *E. coli*.

### **3.4.Fases de la investigación**

Los pasos a seguir para la realización de este proyecto son:

- ✓ Búsqueda de la información bibliográfica relacionada a través de bases de Datos, trabajos de grado y/o artículos de investigación.
- ✓ Análisis de la información bibliográfica disponible. Este análisis permitirá la estructuración de este proyecto, su redacción y la obtención de las conclusiones del mismo que apoyará a la conjugación de todos los estándares marcados en ello.
- ✓ Comienzo de la elaboración de análisis y pruebas para la identificación y validación de los objetivos propuestos anteriormente.
- ✓ Ajuste de parámetros acorde a los resultados.
- ✓ Análisis de diferentes modos de operación y conclusiones finales con resultados obtenidos.

### **3.5.Instrumentos**

Equipos de calidad ambiental en el laboratorio de INNOValgae

### **3.6.Técnicas de recolección de datos**

Todo investigador debe tener en cuenta que la selección y elaboración de técnicas e instrumentos es esencial en la etapa de recolección de la información en el proceso investigativo; pues constituye el camino para encontrar la información requerida que dará respuesta al problema planteado. Las técnicas básicas para la recolección de información, se puede definir como; el medio a través del cual el investigador se relaciona con los participantes para obtener la información necesaria que le permita alcanzar los objetivos planteados en la investigación.

Para esta investigación tenemos las siguientes técnicas:

- ✓ Observación: se capta de forma sistemática y a través de la vista el fenómeno.
- ✓ Recopilación documental: recuperación, análisis, crítica e interpretación de datos secundarios.

## **4. Resultados y análisis**

### **4.1.Producción inicial de biomasa**

Se logró un mejor aislamiento del grupo de cianobacterias con el medio BG11., figura (4) ya establecido para dichos microorganismos, al comparar el crecimiento se observa que este aumenta significativamente en el tiempo, debido a la tendencia de las células en aumentar la talla y acumular metabolitos en fase estacionaria (día 15) que generalmente está acompañada de una disminución en la tasa de crecimiento (HaddenCarter y Storr, 1984). En la producción inicial de inóculos madres se obtuvieron concentraciones cercanas a 0,9 y 1.4 (g/L) para UFPS 003 y 005 respectivamente.



**Figura 4.** *Producción inicial de biomasa en medio BG11.*

**Fuente:** Autor del proyecto.

Para el crecimiento de las cianobacterias aisladas en esta investigación, se seleccionó el medio BG-11, 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). Por ello, para el éxito del aislamiento de las cianobacterias son varios los factores que intervienen en el proceso como lo son por un lado las condiciones de aislamiento, el mantenimiento del medio de cultivo (en este caso medio líquido) y por último los parámetros físico-químicos que determinan la morfología y desarrollo del cultivo. Las modificaciones de las condiciones ambientales y nutricionales afectan el crecimiento y desarrollo de las cianobacterias, debido al equilibrio que dichos organismos presentan al aumentar de forma repentina su tasa de crecimiento ya que se cuenta con un equilibrio de recursos disponibles dentro de su ambiente. El aprovechamiento de los recursos que están presentes está dado principalmente por la capacidad de utilización de estos nutrientes y requerimiento como la luz, temperatura, pH, características fisicoquímicas del cuerpo de agua utilizado para el crecimiento, siendo esta una de las variables más importantes al momento de manipular y optimizar un proceso de obtención de productos de alto valor comercial utilizando células de cianobacterias.

#### **4.2. Preparación y mantenimiento de *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es un patógeno de gran interés clínico por los mecanismos de resistencia antibiótica que posee, lo que lo convierte en microorganismo ideal para la búsqueda de nuevos medicamentos antimicrobianos (Ministerio de la Salud de la Argentina, 2013); Villacís et al., 2014). Adicionalmente, ambas bacterias son de especial interés debido sus características fenotípicas, su ubicuidad en el humano, la diversidad de patologías que causan, sus factores de



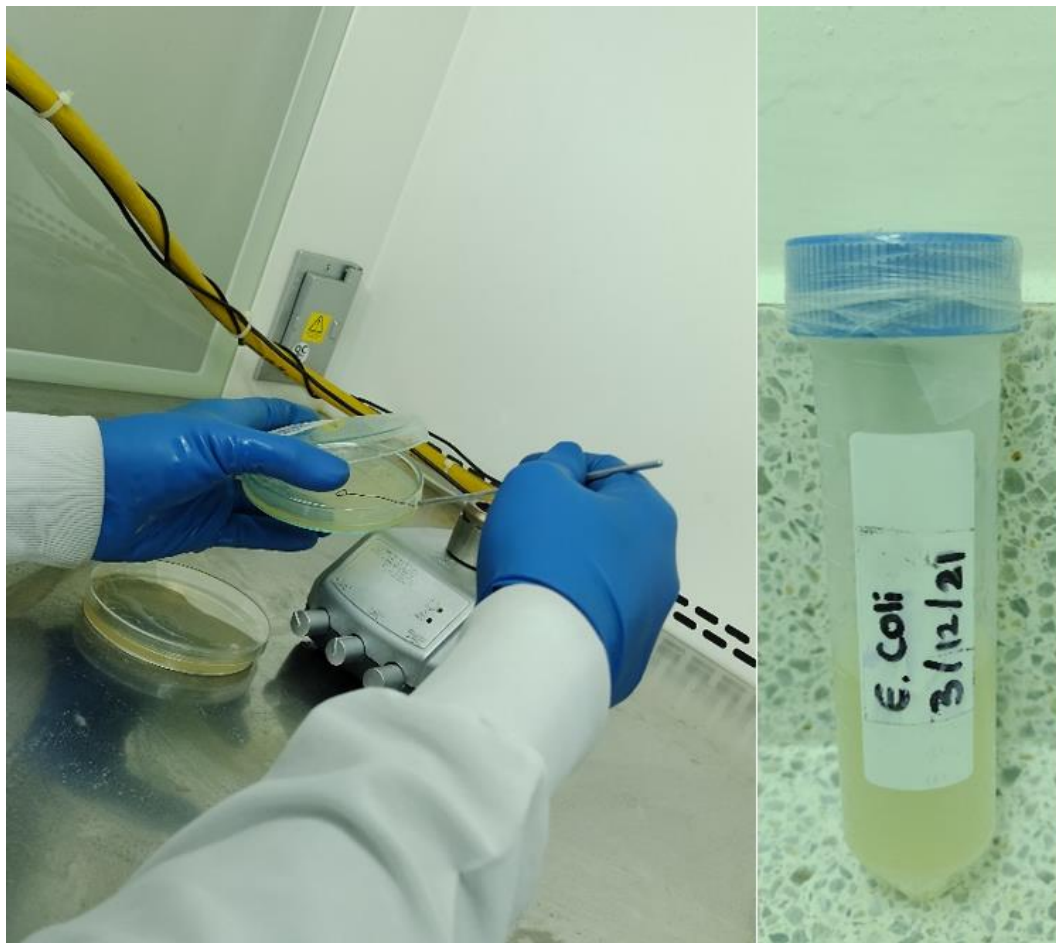
virulencia y sus mecanismos de resistencia antibiótica. Se realizó la identificación de la cepa y obtención de ella en medio sólido como se muestra en la figura 5.



**Figura 5.** Montaje *E. coli* en medio sólido.

**Fuente:** Autor del proyecto.

Empleando la metodología propuesta por (Strieth, y otros, 2020) se pasó *E. coli* ya aislada y caracterizada por la Universidad de Pamplona a un inóculo en medio líquido utilizando agua peptonada como fuente promotora de su crecimiento como lo muestra la figura (6) para la conservación de la cepa; y de esta manera alcanzar la densidad óptima necesaria para las pruebas. Como resultado se obtuvo un crecimiento óptimo, es decir, 100% puro de *E. coli* sin presencia de otro microorganismo alterando el medio y los resultados finales de inhibición.



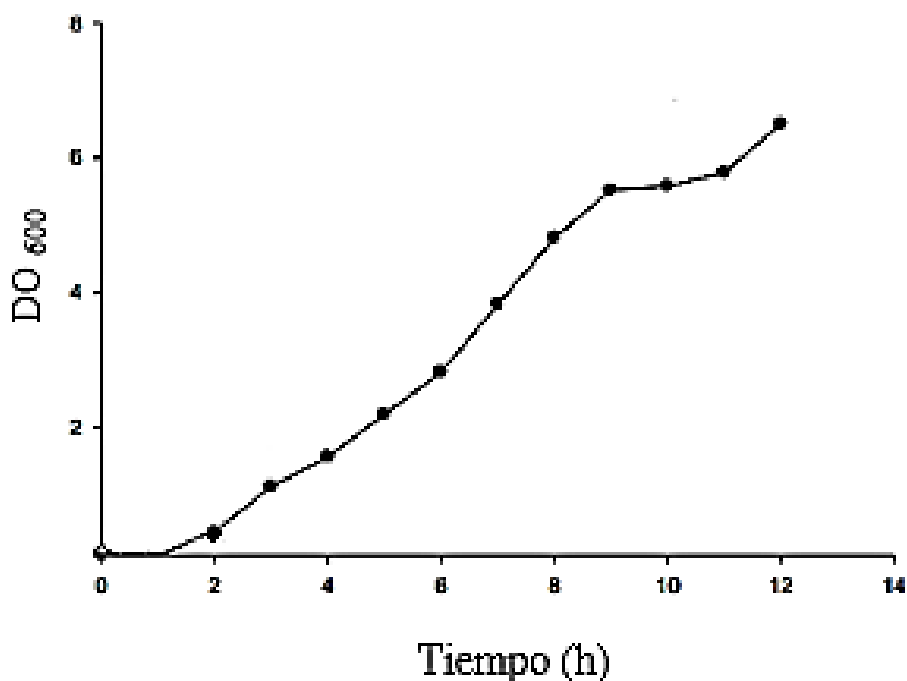
**Figura 6.** *E. coli* enriquecida en agua peptonada.

**Fuente:** Autor del proyecto.

#### **4.3. Cinética de crecimiento de *E. coli*.**

Debido a que los estudios de sensibilidad a agentes son basados en exponer a un determinado número de microorganismos procedentes de un mismo inóculo a la acción de diferentes concentraciones de los agentes antimicrobianos en esta investigación tratándose de especies de cianobacterias, estos resultados pueden verse afectados por la edad y turbidez del

inóculo bacteriano. Por ende, es de importancia conocer las curvas de crecimiento de dichos microorganismos a prueba (patógenos) para optimizar la eficiencia en los ensayos (Guillen, 2012). Se realizó este ensayo con el objetivo de analizar y tomar datos con respecto al crecimiento de *E.coli* y poder elegir la densidad óptima adecuada según lo propuesto por (Strieth, y otros, 2020) Los datos obtenidos de las cinéticas de crecimiento del microorganismo a prueba se muestran en la Figura 7.



**Figura 7.** *Cinética de crecimiento del microorganismo patógeno de prueba.*

**Fuente:** Autor del proyecto.

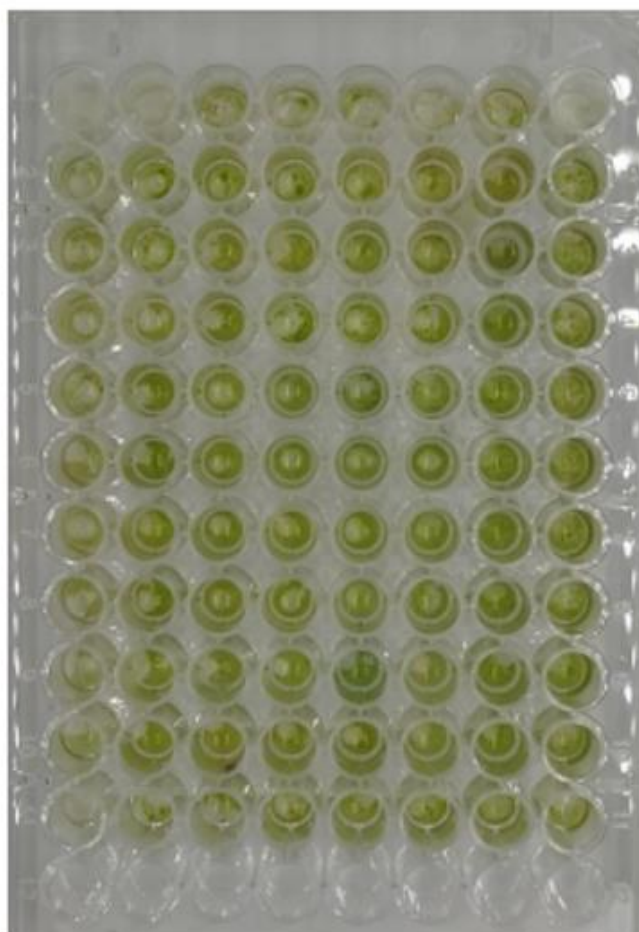
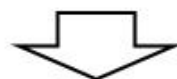
Con el objetivo de homogenizar el inóculo del microorganismo a prueba, para futuros experimentos y evitar variantes atípicas, se decidió utilizar cada cultivo cuando éste se encontrará

a la mitad de la fase exponencial de crecimiento, la cual varía de 5 a 6 horas, dependiendo del microorganismo en este caso *E. coli*.

#### **4.4.Montaje en microplacas**

Se tomó la anterior preparación y se llevó este material a la cabina de flujo laminar donde se realizó la prueba con el medio de cultivo BG-11 garantizándose una prueba óptima y libre de contaminación. Se realizó el montaje en placas de 96 pozos con tapa al cual se le suministra el volumen de medio, agua destilada y cepa a evaluar en diluciones como lo muestra el siguiente plano figura (8), se dejó en agitación por 24 horas, seguidamente se agregó 10 µl de resazurina (Sigma, R7017, B: 0.2 mg mL<sup>-1</sup>) y se evaluaron los resultados.

	○	○	○	○	○	○	○	○
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Medio	50	50	40	30	20	10	50	50
Agua	0	0	10	20	30	40	0	0
Cepa	50	50	50	50	50	50	50	50

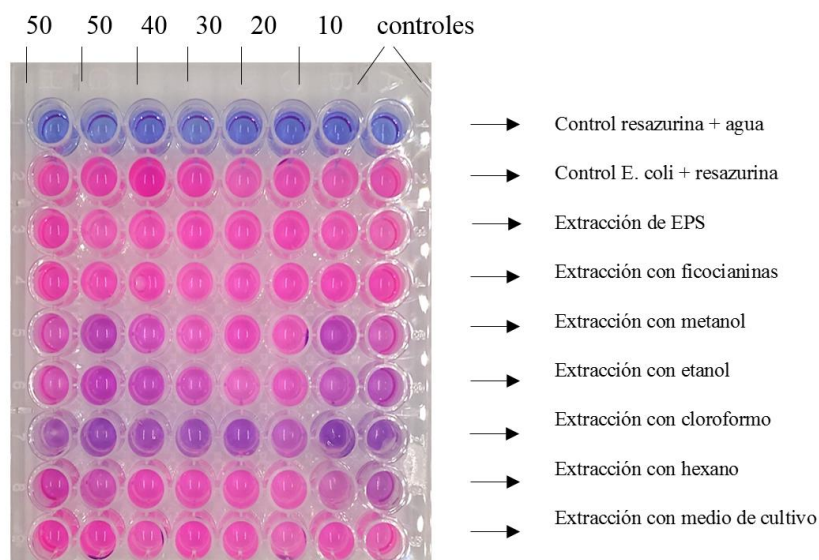


**Figura 8.** Pozos iniciales (inoculación e interacción de la *E. coli* con la cianobacteria sin resazurina).

**Fuente:** Autor del proyecto.

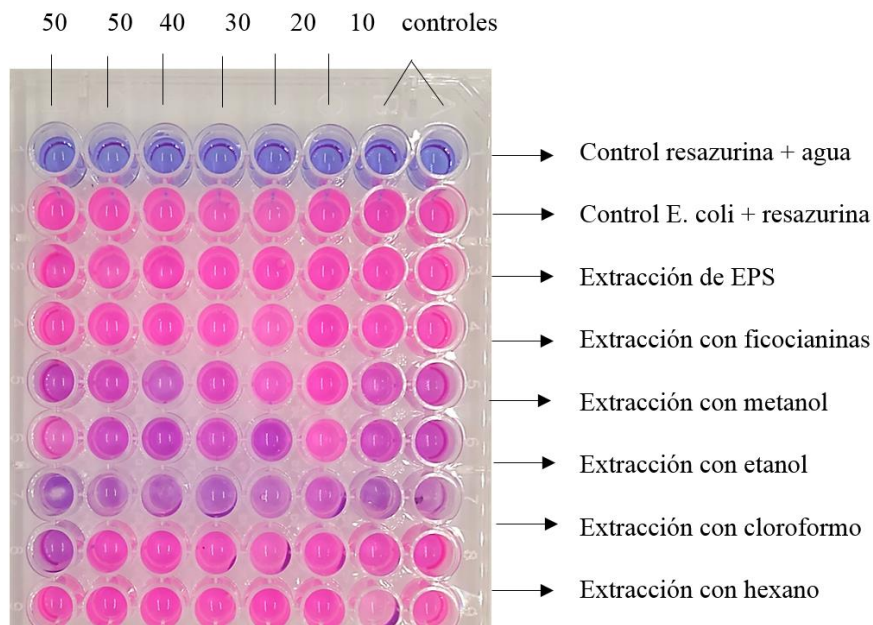
#### 4.5. Pruebas con resazurina

La resazurina como método es importante ya que cumple la función de indicar cuál es la cantidad mínima de antimicrobiano que puede tener la capacidad de impedir el crecimiento de microorganismos en unas condiciones normalizadas, estimando las células viables de color rosa y las no viables tornándolas de un color azul. El color rosa que emiten estas células es debido a que la resazurina es reducida a resofurina por las oxidoreductasas que son encontradas principalmente en las mitocondrias (Castañeda Matute, 2019). En consecuencia, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) utilizando resazurina como indicador de metabolismo celular en UFPS003 (figura 9) y UFPS 005 figura (10) contra *E. coli*. A continuación, se evidencian los resultados que se obtuvieron de los experimentos con diferentes extracciones de las dos cianobacterias.



**Figura 9.** Resultados de las pruebas con la cepa UFPS 003.

**Fuente:** Autor del proyecto.



**Figura 10.** Resultados de las pruebas con la cepa UFPS 005.

**Fuente:** Autor del proyecto.

En todos los experimentos llevados a cabo con los diferentes microorganismos que se trabajaron UFPS 003 y UFPS 005 así como con las diferentes concentraciones, se colocó un control de solo E. coli junto con el solvente y el extracto depende de la prueba con la resazurina como indicador del crecimiento celular, dichos controles no presentaron diferencias significativas. Los datos positivos en cuanto a la actividad antimicrobiana obtenidos a partir del ensayo en placa cumplieron con los principios de normalidad evidenciándose el viraje que efectivamente se describe en la literatura donde hay una inhibición muy similar contra E. coli en las extracciones con cloroformo de ambas cepas; una con más intensidad que la otra, pero cumpliendo con el tono, arrojando un 100% de efectividad en la eliminación de la actividad celular de dicha bacteria.

En ocasiones algunos virajes cambian y no son universales debido a que se trabajaron distintas concentraciones como lo vemos en algunos donde el color es más claro y se evidencia fuertemente la inhibición como en otros donde el viraje tendió a ser entre rosado casi que tirando a lila en algunas concentraciones, pero incluso en ese mismo extracto se encontraban otros pozos con alta actividad antimicrobiana ósea un viraje notorio, lo cual se deduce que no todo es la cianobacteria sino también depende mucho en el experimento con cuales concentraciones no se genera ningún tipo de inhibición mientras que en otras se obtienen mejores resultados de inhibición y tomar estos como los mejores y en las condiciones de dilución óptima para inhibir la bacteria.

se observó de igual manera que se pronunció también una reducción parcial del crecimiento celular en las extracciones con metanol y etanol lo cual se corrobora con la comprobación en caja Petri y arrojó el mismo resultado acertando que la prueba realizada obtuvo los resultados acordes a la técnica que se empleó y así mismo cumpliendo con los objetivos. Al resultar esta inhibición parcial de los productos con metanol y etanol en concentraciones altas, nos demuestra que el metanol es un solvente levemente más polar que permite la extracción de metabolitos como aminoácidos, azúcares, glucolípidos, lípidos, antioxidantes, alcoholes y carotenoides (Mattos, Romasnos, de Sousa, Sasaki y Barreto-Bergter, 2011; Prakash, 32 Seshikala y Singara, 2007; Uma, Sivasubramanian y Devaraj, 2011).

Es importante mencionar, que el o los compuestos presentes en el extracto crudo que inhiben el crecimiento bacteriano, no se han visto afectados por el solvente empleado (etanol o



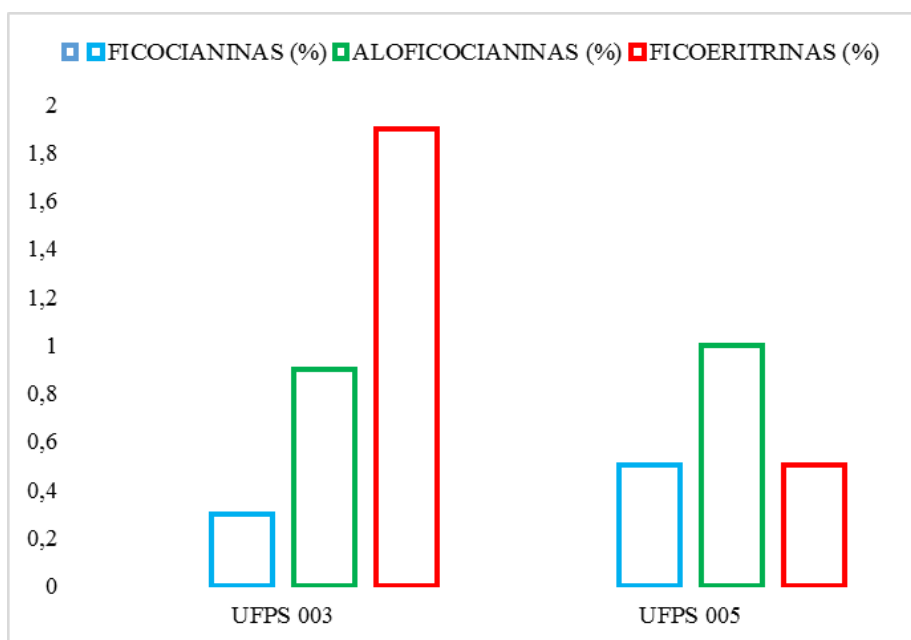
metanol), debido a que no se evidencia una diferencia significativa en el porcentaje de inhibición para *E. coli*, en los ensayos donde se evaluó la capacidad antimicrobiana frente a esta bacteria. Estos resultados concuerdan con investigaciones que han reportado mejores resultados de bioactividad frente a microorganismos patogénicos cuando se realiza una extracción de biomoléculas con etilacetato que con metanol (Patra, Patra, Mahapatra, Thatoi, Das, Sahu y Swain, 2009).

Varios estudios realizados por Uma, Sivasubramanian y Devaraj, (2011); Ghasemi et al., (2007); Andrade, (2018); Debro y Ward, (1979), muestran que la actividad antimicrobiana de los extractos crudos es mayor frente a bacterias Gram positivas como *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* que frente a bacterias Gram negativas como *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*, en esta última se ha visto incluso que no hay bioactividad o la inhibición es muy reducida, por ello es impactante lograr resultados positivos en esta prueba identificando cepas que inhiben estas bacterias.

#### **4.6. Cuantificación de ficocianinas**

En vista del interés biotecnológico que representa la ficocianina, la búsqueda de sistemas de cultivo y técnicas de extracción y purificación más eficientes para la obtención de este pigmento se han venido incrementando. De esta manera, Furuki et al. (2003), lograron obtener un mayor contenido de ficocianina de *A. platensis*, utilizando irradiación ultrasónica 28 kHz, Lamela & Márquez-Rocha (2000) obtuvieron 19,83 mg g<sup>-1</sup> de ficocianina (1,9 % con relación a su masa

seca) al aplicar sonicación y posterior congelación con buffer fosfato (pH = 7). García & Pérez (2011) incrementaron la extracción de ficocianina a partir de *Arthrospira platensis* (Spirulina), realizando la extracción de las ficobiliproteínas con la técnica de congelación-descongelación de  $-4^{\circ}\text{C}$  a  $4^{\circ}\text{C}$ , en cuatro ciclos consecutivos, reportando una pureza de ficocianina igual al 2%, con un porcentaje de recuperación del 2%. En todos los casos, la cuantificación de los contenidos de ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina se realizó mediante espectrofotometría UV-Visible, midiendo las absorbancias de los extractos a los máximos de absorción de 650, 620 y 565nm (Boussiba & Richmond, 1979; Bryant et al., 1979), se obtuvieron los siguientes resultados. El mayor contenido de ficocianina obtenido en esta investigación fue de la cepa UFPS 005 (0.5%), utilizando buffer fosfato (0,05M, pH 6.8) en oscuridad como solvente de extracción.



**Figura 11.** Contenido de ficobiliproteínas (%), obtenido a través de los diferentes métodos de extracción, de *Oscillatoria sp.*, cultivada bajo condiciones controladas de laboratorio en fotobiorreactores.

**Fuente:** Autor del proyecto.

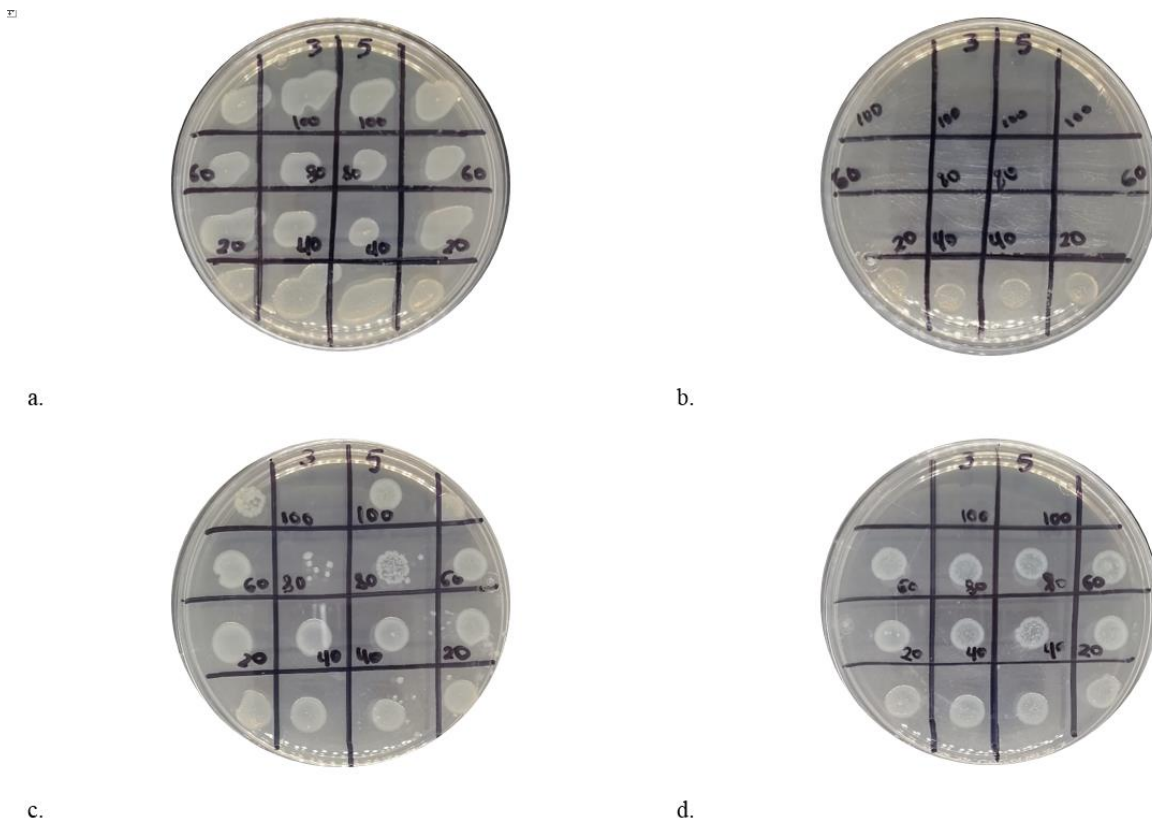
Las mayores concentraciones de ficocianina presentes en los cultivos realizados en el fotobiorreactor se pueden deber a limitación lumínica que afectó a este cultivo, ya que a juicio de Vernerey et al. (2001), quienes realizaron un estudio relacionado con el diseño de fotobiorreactores para el cultivo de *Spirulina*, se podría propiciar la síntesis de ficocianina por parte de las células de esta cianobacteria al verse limitadas de luz, para captar de manera más eficiente la energía luminosa. Así mismo, Ajayan et al. (2012), además de reportar altos valores de clorofila a, también cuantifican el contenido de ficobiliproteínas (PC = 148,1 mg g<sup>-1</sup>; APC = 45,2 mg g<sup>-1</sup>; FE = 5,8 mg g<sup>-1</sup>), encontrando que las mayores concentraciones de estos pigmentos, al realizar la extracción con buffer fosfato, se logran producirse por *Spirulina (Arthrospira) platensis* dependiendo del tipo de nutriente utilizado para su cultivo (urea y KNO<sub>3</sub>) y las distintas intensidades lumínicas.

#### **4.7. Comprobación de experimentos**

Como se observa a continuación tenemos una distribución de la siguiente manera: al lado derecho de la caja petri todas las extracciones de la cepa UFPS 005 y al lado contrario tenemos las cepas UFPS 003 dependiendo de la extracción. Y de esta manera, tenemos la comparación de las dos por prueba que se trabajó. Con el objetivo de minimizar gastos innecesarios de material, tiempo, etc. En las comprobaciones con caja Petri. Seguidamente se toma una ejemplificación de la comprobación de una prueba control con todo el crecimiento celular total evidenciado en todas las concentraciones donde las primeras celdas tienen un 100% de concentración y así mismo va disminuyendo el crecimiento acorde a la disminución de la concentración hasta llegar a los respectivos controles dependiendo de la cepa, esta con el objetivo de comparar a las demás pruebas.

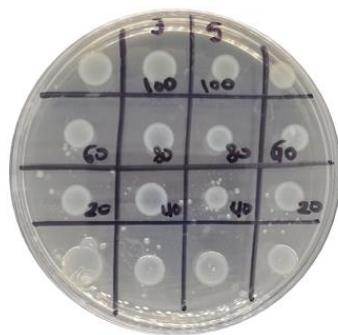
En la figura (12-13) inciso (a) se encuentra el tratamiento que se realizó con medio de cultivo, en el cual se puede observar que por ser el medio natural de la bacteria creció significativamente en todas sus magnitudes, seguidamente se encuentra el tratamiento que se realizó con cloroformo el cual fue el único que arrojó resultados con total inhibición de la bacteria E.coli como se muestra en la inciso (b), en seguida se observa que en los tratamiento que se realizó con metanol (c) y etanol (d) se mostró un bajo porcentaje de inhibición a comparación de los tratamientos con EPS (e), ficocianinas (f) y hexanos en las cuales si no hubo ningún tipo de inhibición contra E.coli.

Si este patrón de inhibición nula o reducida se mantiene para este extracto evaluado o sólo es inefectivo frente a E. coli en las demás pruebas excepto las que dieron positivo para la inhibición. Si este no se mantiene, el mecanismo de acción podría estar relacionado con la inhibición de la síntesis de peptidoglicano. Por otro lado, si este patrón de resistencia en Gram negativos persiste, podría indicar que el compuesto bioactivo es muy grande y por lo tanto incapaz de atravesar la membrana extracelular bacteriana (Andrade, 2018).

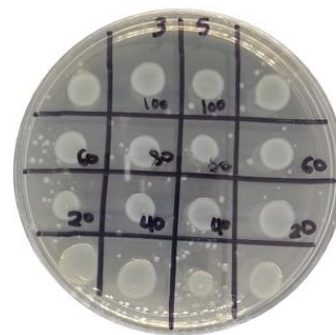


**Figura 12.** Respuesta de *E. coli* a extractos de medio de cultivo (a), cloroformo (b), metanol (c), etanol (d).

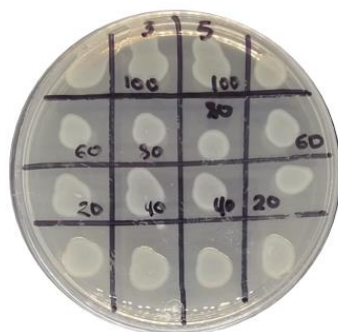
**Fuente:** Autor del proyecto.



e.



f.



g.

**Figura 13.** continuación de la respuesta de *E.coli* a extractos de medio de cultivo, EPS (e), ficocianinas (f), y hexano (g).

**Fuente:** Autor del proyecto.

Seguidamente se anexa la evidencia de los dos extractos de cianobacterias más relevantes o que se caracterizan de una forma más notoria, ya que generan una reducción parcial del crecimiento celular en *E. coli* alrededor de un 70% luchando por inhibirla, pero se observa que no se logra al 100%, por tanto, es interesante observar estos comportamientos y de ahí aplicar en un futuro el mejoramiento de técnicas y extracciones para lograr dicha inhibición completa.

Se observó evidentemente que en las concentraciones más altas en metanol hubo inhibición en una sola cepa a comparación de la UFPS 005 que en su concentración más alta inhibió el 100 %, así como también en las demás concentraciones altas se logra evidencia que el crecimiento de E.coli no fue del todo lo cual concuerda con los virajes de las microplacas y por último, destacar que los controles donde el solvente esta directo no se creó ningún tipo de inhibición lo cual nos lleva a comprobar que el causante de esto son los extractos de las cianobacterias.

Para finalizar se anexan las demás pruebas de comprobación donde efectivamente se cumple en totalidad los resultados obtenidos en los pozos. E. coli es un microorganismo difícil de combatir de manera radical con agentes antimicrobianos, esto puede deberse a la membrana extracelular que está presente en las bacterias Gram negativas le podría dar una protección adicional (Andrade, 2018). Como se observó en las anteriores figuras se evidencio claramente el crecimiento celular del microorganismo en este caso E. coli que no fue inhibida por las cianobacterias en estudio.

## Conclusiones

Se concluye que los extractos con mayor capacidad antimicrobiana son los obtenidos a partir de cloroformo, presentaron mayor inhibición que el obtenido con los demás solventes, no así, en el caso de la extracción con metanol y etanol presento una inhicion parcial lo que nos involucra en un futuro investigar más sobre dichas extracciones, enfocados más en la causa por la cual no se inhibió un 100% o en su defecto aportar a que modificaciones nos pueden generar mejores resultados de los esperados.

Se concluye que en el caso de los tratamientos con metanol presenta un tipo de inhibición parcial en las concentraciones más altas en comparación de los tratamientos con etanol en el cual posee una inhibición más amplia en altas concentraciones; resulta más efectivo ya que abarca un halo de inhibición más grande en su mayoría como método a destacar y realizar modificaciones para conseguir esa inhibición completa.



## Bibliografía

- Abdel-Raouf, N. (August de 2008). Antibiotic activity of two *Anabaena* species against four fish pathogenic *Aeromonas* species. *African Journal of Biotechnology*, 7(15), 2644-2648. Recuperado el 20 de Julio de 2021, de <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/59115>
- Alsenani, F., Tupally, K., Chua, E., Eltanahy, E., Alsufyani, H., Parekh, H., & Schenk, P. (December de 2020). Evaluation of microalgae and cyanobacteria as potential sources of antimicrobial compounds. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28(12), 1834-1841. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.11.010>
- Alvarez Martins, M., Gimenez Perez, M., Reynaga, E., Carabias, L., & Deltell, J. (2020). Novedades en la duración recomendada de los tratamientos antibióticos. *FMC - Formación Médica Continuada en Atención Primaria*, 27(5), 247-253. Recuperado el 23 de Agosto de 2021, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1134207219302701?via%3Dihub>
- Bhunja, B., Prasad Uday, U., Oinam, G., Mondal, A., Bandyopadhyay, T., & Tiwari, O. (2018). Characterization, genetic regulation and production of cyanobacterial exopolysaccharides and its applicability for heavy metal removal. *Carbohydrate Polymers*, 179(1), 228-243. doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.091>
- Castañeda Matute, C. (2019). Matute, C.N., & Carolina, V. (2019). Evaluación *in vitro* de la capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales de moringa (*Moringa oleífera* Lam.) y altamisa (*Ambrosia arborescens* Mill.) frente a la bacteria *Klebsiella pneumoniae* ATCC

70693. Recuperado el 18 de Septiembre de 2021, de <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18083>

Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D. J., & Chang, J. (January de 2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102(1), 71-81. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>

Collins, J., & Brown Eric, B. M. (2019). Overcoming Antibiotic Resistance. *Cell Host & Microbe*, 26(1), 8-11. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.06.007>

Delattre, C., Guillaume, P., Céline, L., & Michaud, P. (15 de November de 2016). Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1159-1179. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.001>

Flores Melo, X., De la Rosa, N., Wenzel, M., & Diaz, M. (2019). Cianobacterias ácido-termófilas del Complejo Termal Copahue, Neuquén, Argentina. *Sistemática y Taxonomía de Algas y Hongos*, 7(1), 39-56. Recuperado el 12 de Noviembre de 2021, de <http://www.ojs.darwin.edu.ar/index.php/darwiniana/article/view/834>

Frassanito, R., Cantonati, M., Tardio, M., Mancini, I., & Guella, G. (2005). On-line identification of secondary metabolites in freshwater microalgae and cyanobacteria by combined liquid chromatography–photodiode array detection-mass spectrometric techniques. *Journal of Chromatography A*, 1082, 33-42. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.02.066>

Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (July de 2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 10(4), 369-378. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>

Gilaberte, Y., & Gonzalez, S. (2010). Update on Photoprotection. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 101(8), 659-672. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ad.2010.04.003>

Gogineni, V., & Hamann, M. (2018). Marine natural product peptides with therapeutic potential: Chemistry, biosynthesis, and pharmacology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1862(1), 81-196. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.08.014>

Haque, F., Banayan, S., Yee, J., & Chiang, Y. W. (september de 2017). Extraction and applications of cyanotoxins and other cyanobacterial secondary metabolites. *Chemosphere*, 183(1), 164-175. Recuperado el 15 de 2021 de julio, de <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.106>

Jain, R. R., Tharanathan, R., & Bhosle, N. (2005). Extracellular Polysaccharide Production by Thraustochytrid Protists. *Marine Biotechnology*, 7, 184-192. doi:<https://doi.org/10.1007/s10126-004-4025-x>

Jaspars, M., & Lawton, L. A. (1998). Cyanobacteria - A novel source of pharmaceuticals. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 1(1), 77-84. Recuperado el 17 de Julio de 2021, de <http://www.scopus.com/inward/record.url?scp=0002675854&partnerID=8YFLogxK>

Jimenez velasquez, S. d., Torres Higuera, L. D., Parra Arango, J. L., Rodriguez Bautista, J. L., Garcia Castro, F. E., & Patiño Burbano, R. E. (june de 2020). Profile of antimicrobial resistance in isolates of Staphylococcus spp. obtained from bovine milk in Colombia. *Revista Argentina de Microbiología*, 2, 121-130. Recuperado el 23 de Agosto de 2021, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754119300604?via%3Dihub>

- Kumar, D., Kastanek, P., & Adhikary, S. (July de 2018). Exopolysaccharides from Cyanobacteria and Microalgae and Their Commercial Application. *Current Science*, 115(2), 234-241. doi:10.18520/cs/v115/i2/234-241
- March-Rossello, G. A. (March de 2017). Rapid methods for detection of bacterial resistance to antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(3), 182-188. doi:https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.12.005
- Marrez, D. A., Sultan, Y. Y., & Elabbas Embaby, M. A. (2017). Biological Activity of the Cyanobacterium *Oscillatoria brevis* Extracts as a Source of Nutraceutical and Bio-preservative Agents. *revista internacional de farmacología*, 13(8), 1010-1019. doi:10.3923/ijp.2017.1010.1019
- Mena Aguirre, D. A. (2020). *Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de cianobacterias y microalgas aisladas de páramos ecuatorianos frente a cepas de Staphylococcus aureus y Escherichia coli*. Recuperado el 1 de Septiembre de 2021, de <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/18036>
- Metting, B., & Pyne, J. (1986). Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme and Microbial Technology*, 8(7), 386-394. doi:https://doi.org/10.1016/0141-0229(86)90144-4
- Mi, Y., Zhang, J., He, S., & Yan, X. (2017). New Peptides Isolated from Marine Cyanobacteria, an Overview over the Past Decade. *marine drugs*, 15(5), 132. Recuperado el 29 de Agosto de 2021, de <https://www.mdpi.com/1660-3397/15/5/132>
- Ministerio de la Salud de la Argentina. (2013). <https://bancos.salud.gob.ar/>. Recuperado el 25 de Octubre de 2021, de [https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2018-10/0000000334cnt-ciano\\_2017.pdf](https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2018-10/0000000334cnt-ciano_2017.pdf).

- Moheimani, N., Borowitzka, M., Ispepsky, A., & Fon Sing, S. (2013). Standard Methods for Measuring Growth of Algae and Their Composition. *Algae for Biofuels and Energy*, 5, 265-284. doi:[https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9_16)
- Mundt, A. j., Mell, L. K., & Roeske, J. C. (2003). Preliminary analysis of chronic gastrointestinal toxicity in gynecology patients treated with intensity-modulated whole pelvic radiation therapy. *CLINICAL INVESTIGATION*, 56(5), 1354-1360. doi:[https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(03\)00325-0](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(03)00325-0)
- Nainangu, P., Matharasi Antonyraj, A. P., Subramanian, K., Kaliyaperumal, S., & Gopal, S. (2020). In vitro screening of antimicrobial, antioxidant, cytotoxic activities, and characterization of bioactive substances from freshwater cyanobacteria *Oscillatoria* sp. SSCM01 and *Phormidium* sp. SSCM02. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101772. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101772>
- Ochoa Amado, L. S., & Sarmiento Mora, A. J. (2018). *Estudio fitoquímico de la especie vegetal Bucquetia glutinosa (L.f.) DC (Melastomataceae) y evaluación de su actividad biológica*. Recuperado el 20 de Octubre de 2021, de <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/996>
- Oteo Iglesias, J. (MAY de 2019). Vigilancia activa de la resistencia a antibióticos Active surveillance of antimicrobial resistance. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(1), 26-31. Recuperado el 25 de Agosto de 2021, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0213005X1930179X?via%3Dihub>

- Sanchez Sebastian, L. A. (2018). *Evaluación Fitoquímica Y Capacidad Antioxidante In Vitro Del Extracto Etanólico De Nostoc Commune (Cushuro)*. Recuperado el 30 de Septiembre de 2021, de <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/25533>
- Sprigg, K., & Pietrangeli, C. (2019). Bacterial Antibiotic Resistance: on the Cusp of a Post-antibiotic World. *Curr Treat Options Infect Dis*, *11*, 42-57. doi:<https://doi.org/10.1007/s40506-019-0181-4>
- Strieth, D., Stiefelmaier, J., Wrabl, B., Schmeckebyer, A., Di Nonno, S., K, M., & Ulber, R. (2020). A new strategy for a combined isolation of EPS and pigments from cyanobacteria. *J Appl Phycol*, *32*, 1729-1740. doi:<https://doi.org/10.1007/s10811-020-02063-x>
- Tiwari, O. N., Bandyopadhyay, T. K., Annpurna, K., Minakshi, S., Indrama, T., & Muthuraj, M. (september de 2020). Biosynthesis, purification and structure-property relationships of new cyanobacterial exopolysaccharides. *Polymer Testing*, *89*, 106592. doi:<https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2020.106592>
- Trabelsi, L., Mnari, A., Abdel-Daim, M., Abid-Essafi, S., & Lotfi, A. (2016). Therapeutic properties in Tunisian hot springs: first evidence of phenolic compounds in the cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. biomass, capsular polysaccharides and releasing polysaccharides. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, *515*. doi:<https://doi.org/10.1186/s12906-016-1492-3>
- Uhliaríková, I., Matulová, M., & Capek, P. (1 de December de 2020). Structural features of the bioactive cyanobacterium *Nostoc* sp. exopolysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, *164*, 2284-2292. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.113>

Wang, Z., Chen, Q., Zhang, J., Guan, T., Chen, Y., & Shi, W. (2020). Critical roles of cyanobacteria as reservoir and source for antibiotic resistance genes. *Environment International*, *144*, 106034. Recuperado el 27 de Agosto de 2021, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412020319899?via%3Dihub>