

UNIVERSIDAD DEL MAR

Campus Puerto Ángel



EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Calothrix* sp.

TESIS

Que para obtener el título de
LICENCIADA EN BIOLOGÍA MARINA

Presenta:

ADANELY ERÉNDIRA HERNÁNDEZ MUÑOZ

Directora de tesis: M. en C. Ma. Nieves Trujillo Tapia

M. EN C. ANA MARÍA TORRES HUERTA
JEFA DE LA CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA
UNIVERSIDAD DEL MAR
P R E S E N T E

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

Después de haber analizado y evaluado la tesis “EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Calothrix* sp.”, que presenta la Pas. Biól. Mar. Adanely Eréndira Hernández Muñoz, consideramos que cumple con los requisitos académicos para ser defendida en el examen profesional.

COMISIÓN REVISORA

M. en C. Ma. Nieves Trujillo Tapia
Universidad del Mar (UMAR)
Campus Puerto Ángel
Directora

Dr. Ramón I. Arteaga Garibay Centro
Nacional de Recursos Genéticos
(CNRG)
Revisor

Dr. J. Marco V. Ramírez Mares
Universidad del Mar (UMAR) Campus
Puerto Ángel
Revisor

M. en C. Yolanda Huante González
Universidad del Mar (UMAR)
Campus Puerto Ángel
Revisora

Dr. Edgar Francisco Rosas Alquicira
Universidad del Mar (UMAR)
Campus Puerto Ángel
Revisor

RESUMEN

Entre los organismos más prometedores dentro de la biotecnología se encuentran las cianobacterias, a partir de las cuales se ha aislado una amplia variedad de compuestos con propiedades insecticidas, antibioincrustantes y antibióticas, entre otras. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antibacteriano de los extractos metanólicos de la cianobacteria *Calothrix* sp. en cepas de bacterias patógenas para el humano. El trabajo se dividió en tres etapas. La primera consistió en las cinéticas de crecimiento de la cianobacteria en dos medios, uno suplementado con nitrógeno (BG-11) y el otro sin nitrógeno (medio BG-11₀); dichas cinéticas se llevaron durante 42 días, tomando muestras cada siete para cuantificar los parámetros de: peso seco (Tredici *et al.* 1991), proteínas totales intra y extracelulares (Lowry 1951), y amonio (APHA 1992). De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionó el medio BG-11 debido a que en éste se presentó una mayor cantidad de proteínas intracelulares. La segunda etapa consistió en la producción de biomasa, escalando los cultivos a 20 L los cuales se cosecharon a los 28 y 56 días de cultivos respectivamente. La biomasa se concentró, liofilizó y maceró y posteriormente se llevaron a cabo extracciones con tres sistemas de metanol agua (75:25 v:v, 85:15 v:v y 95:5 v:v) utilizando 50 mg de biomasa, 10 mL del solvente y tres tiempos de extracción de 30 min, obteniendo un total de 30 mL de extracción que enseguida se evaporaron con un rotavapor. Con los tres sistemas y dos tiempos de cosecha se obtuvieron seis extractos (E75-4, E85-4, E95-4, E75-8, E85-8 y E95-8) que se concentraron, esterilizaron con filtros de 0.22 µm y se les cuantificaron las proteínas totales (Bradford 1976). La tercera y última etapa contempló los bioensayos, con cepas de referencia que incluyeron a *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Vibrio parahaemolyticus* (aislamiento clínico), *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* Cowan en microplaca con 12 concentraciones (100, 10, 1, 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} y 1×10^{-9} µg_{Prot}/mL) de cada extracto, incubados por 24 h. Se concluyó que los extractos crudos de *Calothrix* sp. poseen un efecto inhibitorio en *V. parahaemolyticus* mientras que en el resto de las bacterias no hubo efecto inhibitorio.

ABSTRACT

Among the most promising organisms within biotechnology are cyanobacteria, from which has been isolated a variety of compounds with insecticidal, antibiofouling and antibiotic properties, among others. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antibacterial effect of methanol extracts of the cyanobacterium *Calothrix* sp. in reference strains of bacteria pathogenic to humans. The work was divided into three stages. The first consisted of the growth kinetics of the cyanobacterium in two medium, one supplemented with nitrogen (BG-11) and the other without nitrogen (BG-11₀), the kinetics were carried for 42 days, taking samples every seven days for quantifying the parameters: dry weight (Tredici *et al.* 1991), total intra and extracellular proteins (Lowry 1951), and ammonium (APHA 1992). According to results, BG-11 medium was selected because of the improvement in amount of intracellular proteins. The second stage was the production of biomass, making 20 L cultures which were harvested at 28 and 56 days of culture respectively. Biomass was concentrated, macerated and lyophilized, then the extractions were performed with three methanol:water systems (75:25 v:v, 85:15 v:v y 95:5 v:v) using 50 mg of biomass, 10 mL of solvent and three extraction times of 30 min, giving a total of 30 mL of extraction. The solvent was evaporated with a rotary evaporator. With all three systems, and two harvest times, six extracts were obtained (E75-4, E85-4, E95-4, E75-8, E85-8 y E95-8) which were concentrated, sterilized with filters of 0.22 µm and total proteins were quantified (Bradford 1976). The third and final stage consisted of bioassays with *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Vibrio parahaemolyticus* (clinical isolate), *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* Cowan in microplate with 12 concentrations (100, 10, 1, 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} y 1×10^{-9} µg_{Prot}/mL) of each extract, incubated for 24 h. With this, it was concluded that the crude extracts of *Calothrix* sp. have an inhibitory effect on *V. parahaemolyticus*, while in the rest of bacteria have not inhibitory effect.

DEDICATORIA

A las personas más especiales en mi vida: Mi padre Ernesto Hernández, mi madre Leonila Muñoz, mi hermana Evelyn Hernández y mi pequeña Zoe Arias

AGRADECIMIENTOS

Para la M. en C. Nieves Trujillo quien dirigió la presente investigación, por todos y cada uno de sus consejos, enseñanzas, apoyo a manos llenas y por las preciadas y amenas charlas durante ésta travesía.

Al proyecto “Evaluación del uso de biofertilizantes en el cultivo de papaya” y a la beca de titulación otorgada por la SEP, que proporcionaron parte del apoyo económico para elaboración de la tesis.

A los investigadores que conformaron al comité de revisión: M. en C. Yolanda Huante González, Dr. Ramón I. Arteaga Garibay, Dr. J. Marco V. Ramírez Mares y Dr. Edgar F. Rosas Alquicira, por todas sus valiosas observaciones, recomendaciones y conocimientos transmitidos.

Al M. en C. Pedro Cervantes Hernández, no sólo por el apoyo brindado en la parte estadística del trabajo, también por esas chispitas de humor que realmente hicieron muy ligera dicha sección.

A la Dra. Karla Lira de León, una gran persona e investigadora, que brindó empatía y muchos conocimientos en una parte vital del trabajo.

Para Laura Juárez y Gaby Hernández por las enseñanzas brindadas en materia de cianobacterias, así como a Coral Mirón por esa disposición que la caracteriza y conocimientos transmitidos.

Al Ing. Arturo Martínez por el espacio otorgado en el laboratorio de acuicultura para los cultivos y a Marisol por todas las atenciones y ayuda prestada.

Al Centro Nacional de Recursos Genéticos y en especial al Dr. Ramón Arteaga, al M. en C. Daniel Martínez y a la Ing. quím. Yunniba Corral por abrirme las puertas y brindarme un espacio de trabajo cálido, armonioso y ameno para llevar a cabo la tercera parte de experimentación, además de la paciencia y disponibilidad durante el aprendizaje de las técnicas.

A todos mis compañeros de grupo, especialmente a: Alejandra Lagunas, Juan Trujano, David López, Jeimy Santiago, Alejandro Cruz y Alejandra Galán.

A mis amigos Ana Robles, Francisco Muñoz, Mariel Juárez, Mirella Ramírez y Jesús Gutiérrez por todas las palabras, ánimo, compañía, empatía, detalles y sobre todo por su esencia como personas, que eso nunca cambie.

A Doña Lucy y Don Xavier, para quienes no encuentro las palabras para agradecerles plenamente el abrigo que me dieron desde que los conocí, por esas comidas que sabían a cariño y por todas las charlas, juegos y momentos que significaron más que mucho para mí. Siempre van a estar en mi corazón.

A mis tíos Ana, Armando y Antonia, a mis primos Aline, Avril, Alaín, Armando Gustavo y Jorge por todo el apoyo que me dieron durante éstos 6 años, éste éxito también es suyo.

A mi amada familia: mis papás Ernesto Hernández y Leonila Muñoz, mi hermani Evelyn Hernández y a mi pequeña Zoé que siempre fueron y serán mi inspiración y motivación.

A mi perrito Iron, mi fiel compañero, por todo el cuidado, cariño y lealtad.

Por último, y no menos importante, a Dios porque mi destino ha sido formar parte de una hermosa familia, conocer a tan excelentes personas y por permitirme cumplir una de mis grandes metas en la vida.

Los análisis y procedimientos se llevaron a cabo en los laboratorios de microbiología, acuicultura, biotecnología, análisis químico e instrumentación de la Universidad del Mar, campus Puerto Ángel. Los bioensayos se llevaron a cabo en las instalaciones del laboratorio de recursos genéticos microbianos del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) ubicado en Tepatitlán, Jalisco a cargo del Dr. Ramón I. Arteaga Garibay.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
ÍNDICE GENERAL	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1. Cianobacterias	2
2.1.1. Hábitat	2
2.1.2. Crecimiento	2
2.1.3. Producción de metabolitos secundarios.....	3
2.1.3.1. Antibacterianos.....	6
2.2. <i>Calothrix</i>	6
2.3. Bacterias patógenas	7
2.3.1. Cepas de referencia	9
3. ANTECEDENTES.....	11
3.1. Extracción de metabolitos proteicos	13
4. JUSTIFICACIÓN.....	14
5. HIPÓTESIS	15
6. OBJETIVOS	15
7. MATERIAL Y MÉTODOS	16
7.1. Diseño experimental	16
7.2. Cinética de crecimiento.....	17
7.2.1. Determinación de biomasa a través de peso seco (Tredici <i>et al.</i> 1991)	17

	Página
7.2.2. Cuantificación de amonio (APHA 1992).....	18
7.2.3. Extracción de proteínas.....	18
7.2.4. Cuantificación de proteínas totales (Lowry 1951)	18
7.2.4.1. Curva de calibración de proteínas	19
7.3. Extracciones metanólicas.....	20
7.3.1. Cuantificación de proteínas totales (Bradford 1976)	21
7.3.2. Rendimiento de extractos.....	22
7.3.2.1. Rendimiento de extracciones en peso seco.....	22
7.3.2.2. Rendimiento de extracción proteica.....	23
7.4. Bioensayos en cepas bacterianas.....	23
7.4.1. Reidentificación de bacterias	23
7.4.1.1. Prueba de Oxidasa.....	24
7.4.1.2. Prueba de Catalasa.....	25
7.4.1.3. Tinción Gram.....	25
7.4.1.4. Pruebas API 20E	26
7.4.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) en microdiluciones (MacLowry et al. 1970 & CLSI 2007)	28
7.5. Análisis de datos.....	30
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
8.1. Cinéticas de <i>Calothrix</i> sp.....	35
8.2. Extractos.....	43
8.3. Bioensayos en bacterias	48
9. CONCLUSIONES.....	70
10. RECOMENDACIONES Y PESPECTIVAS	71
11. REFERENCIAS.....	72
ANEXOS.....	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Tipos, origen y propiedades de las toxinas de cianobacterias (Aguayo & Muñoz 2001).	5
2. Preparación de la curva de calibración de proteínas para el método de Lowry.	19
3. Preparación de la curva de calibración de proteínas para el método de Bradford.	21
4. Resultados de las pruebas de catalasa, oxidasa y tinción Gram.	26
5. Diseño experimental del ANDEVA con $\alpha = 0.05$. Información por interacción dependiente-independiente categórica (*).	30
6. Diseño experimental del ANDEVA multifactorial con $\alpha = 0.05$. Semana 4, 8; sistema de solvente, información por interacción dependiente-independiente categórica (*) en mg. .	31
7. Tercer diseño experimental para el ANDEVA multifactorial $\alpha = 0.05$	32
8. Concentración y rendimiento de los extractos y proteínas en los dos tiempos de cosecha (ver anexo 5 para datos crudos).	44
9. Valores de probabilidad en la prueba LSD de Fisher. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cantidad de extracción por extracto se presentan de color rojo.	44
10. Resultados del análisis LSD de Fisher.	48
11. Análisis discriminadorio lambda parcial.	51
12. Preparación de medios BG-11 ₀ y BG-11.	85
13. Preparación de medio caldo soya tripticaseína.	85
14. Preparación de medio agar soya tripticaseína.	86
15. Preparación de medio caldo Mueller-Hinton.	86
16. Reactivos para la cuantificación de amonio.	87
17. Reactivos para la cuantificación de proteínas totales.	87
18. Reactivos para tinción Gram.	87
19. Tabla de lectura para pruebas de API.	90
20. Datos de extracciones.	91
21. Concentración total y proteica de extractos.	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. <i>Calothrix</i> sp. A: Heterocito, B: Células vegetativas y C: Vainas (Tomada por: Hernández-Muñoz 2012).	6
2. Bioactividad de los compuestos obtenidos a partir de cianobacterias (Kunwar <i>et al.</i> 2011).	11
3. Cinética de crecimiento. A: Tratamiento con medio BG-11 ₀ B: Tratamiento con medio BG-11 y R#: Réplicas	16
4. Diseño de microplacas para bioensayos. B1: Filas para bioensayo de bacteria “X” y B2: Filas para bioensayo de bacteria “Y”	17
5. Microplaca con extractos (pozos en A B y C) y diluciones de BSA para la curva de calibración (tres primeros pozos de las filas E, F, G y H) con el reactivo de Bradford.	22
6. Tinción Gram a 100X de A: <i>A. hydrophila</i> , B: <i>E. coli</i> , C: <i>S. aureus</i> y D: <i>V. parahaemolyticus</i>	26
7. Prueba de API para A: <i>V. parahaemolyticus</i> , B: <i>Aeromonas hydrophila</i> C: <i>E. coli</i> y D: Placa recién inoculada.	28
8. Similitud/diferencia de producción entre los tratamientos (medios) de a: biomasa y b: proteínas extracelulares de <i>Calothrix</i> sp.	36
9. Similitud/diferencia de producción entre los tratamientos (medios) de a: Proteínas intracelulares y b: Amonio de <i>Calothrix</i> sp.	37
10. Cinéticas de crecimiento. a: Biomasa y b: NH ₄ ⁺ . El círculo relleno (●) corresponde a los resultados obtenidos con medio BG-11 y el vacío (○) a aquellos obtenidos con medio BG-11 ₀	38
11. Cinéticas de crecimiento. a: Proteínas intracelulares y b: Proteínas extracelulares. El círculo relleno (●) corresponde a los resultados obtenidos con medio BG-11 y el vacío (○) a aquellos obtenidos con medio BG-11 ₀	40
12. Miligramos por extracción por sistema de solvente, extraídos durante la cuarta (●) y octava semana (●) de cosecha.	45
13. Comportamiento de la media y desviación estándar de a: Interacción bacteria*extracto y b: Interacción bacteria*concentración.	49
14. Comportamiento de la media y desviación estándar del crecimiento bajo la interacción bacteria*extracto*concentración (μg _{Prot} /mL), donde los círculos vacíos corresponden a los extractos de cuatro semanas (E75-4 (○), E85-4 (○) y E95-4 (○)) y los círculos rellenos corresponden a los extractos de ocho semanas (E75-8 (●), E85-8 (●) y E95-8 (●)).	50

Figura	Página
15. Agrupación de los conteos discriminantes de <i>A. hydrophila</i> (●), <i>V. parahaemolyticus</i> (●), <i>E. coli</i> (●) y <i>S. aureus</i> (●).	51
16. Porcentaje de viabilidad de a: <i>A. hydrophila</i> y b: <i>V. parahaemolyticus</i> con el extracto E75-4.	53
17. Porcentaje de viabilidad de a: <i>E. coli</i> y b: <i>S. aureus</i> con el extracto E75-4.	54
18. Porcentaje de viabilidad de a: <i>A. hydrophila</i> y b: <i>V. parahaemolyticus</i> con el extracto E85-4.	55
19. Porcentaje de viabilidad de a: <i>E. coli</i> y b: <i>S. aureus</i> con el extracto E85-4.	56
20. Porcentaje de viabilidad de a: <i>A. hydrophila</i> y b: <i>V. parahaemolyticus</i> con el extracto E95-4.	57
21. Porcentaje de viabilidad de a: <i>E. coli</i> y b: <i>S. aureus</i> con el extracto E95-4.	58
22. Porcentaje de viabilidad de a: <i>A. hydrophila</i> y b: <i>V. parahaemolyticus</i> con el extracto E75-8.	59
23. Porcentaje de viabilidad de a: <i>E. coli</i> y b: <i>S. aureus</i> con el extracto E75-8.	60
24. Porcentaje de viabilidad de a: <i>A. hydrophila</i> y b: <i>V. parahaemolyticus</i> con el extracto E85-8.	61
25. Porcentaje de viabilidad de a: <i>E. coli</i> y b: <i>S. aureus</i> con el extracto E85-8.	62
26. Porcentaje de viabilidad de a: <i>A. hydrophila</i> y b: <i>V. parahaemolyticus</i> con el extracto E95-8.	63
27. Porcentaje de viabilidad de a: <i>E. coli</i> y b: <i>S. aureus</i> con el extracto E95-8.	64
28. Microplacas de los bioensayos realizados con los extractos de cuatro semanas, a las 24 h de incubación y el CTT. A-B: Bioensayos con E75-4, C-D: Bioensayos con E85-4 y E-F: bioensayos con E95-4. A, C y E: <i>A. hydrophila</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> y B, D y F: <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	65
29. A-B: Microplacas de los bioensayos realizados con los extractos de ocho semanas, a las 24 h de incubación y el CTT. Bioensayos con E75-8, C-D: Bioensayos con E85-8 y E-F: bioensayos con E95-8. A, C y E: <i>A. hydrophila</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> y B, D y F: <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	66
30. Curva de calibración de proteínas (Lowry 1951).	88
31. Curva estándar de proteínas totales (Bradford 1976).	88
32. Curva de calibración de amonio.	89