



**Universidad Autónoma de Guerrero**  
**Facultad de Ciencias Químico Biológicas**  
**Facultad de Ciencias de la Tierra**

---

**Maestría en Biociencias**

**“Actividad antibacteriana de extractos totales  
obtenidos de diatomeas marinas aisladas de la Bahía  
Santa Lucía de Acapulco, Guerrero”.**

**TESIS**

**P R E S E N T A :**

**Q.B.P. CYNTHIA NÁJERA ARCE**

**Director de tesis:** Dr. Donaciano Pérez Castro

**Co-Directora de tesis:** Dra. Natividad Castro Alarcón

Chilpancingo de los Bravo, Guerrero México, abril de 2017



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA**  
**Maestría en Biociencias**

Av. Lázaro Cárdenas S/N. Ciudad Universitaria. Chilpancingo, Gro. C.P. 39090. Tel 01 747 47 1 93 10 ext: 3601

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 20 días del mes de enero de dos mil diecisiete, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Biociencias, para examinar la tesis titulada **“Actividad antibacteriana de extractos totales obtenidos de diatomeas marinas aisladas de la Bahía Santa Lucía de Acapulco, Guerrero”**, presentada por la alumna Cynthia Nájera Arce, para obtener el Grado de Maestría en Biociencias. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dr. Donaciano Pérez Castro  
Dirección de tesis

Dra. Natividad Castro Alarcón  
Codirección de tesis

Dra. Jeiry Toribio Jiménez

Dra. Patricia Álvarez Fitz

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
 UAGro  
Unidad Académica de  
Ciencias Químico Biológicas  
DIRECCIÓN 014 - 2012

Dra. Isela Farra Rojas  
Coordinadora del Posgrado de la Facultad de  
Ciencias Químico Biológicas

Dra. Ma. Nieves Trujillo Tapia

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
 UAGro  
Unidad Académica de  
Ciencias Químico Biológicas  
DIRECCIÓN 2014 - 2015

Dra. Amalia Vences Velázquez  
Directora de la Facultad de Ciencias Químico  
Biológicas

Esta investigación se llevó a cabo en la Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro). El aislamiento y cultivo de diatomeas marinas se realizó en el Laboratorio de Biotecnología e Impacto Ambiental de la Escuela Superior de Ciencias Ambientales en Acapulco de Juárez, Gro. La obtención de extractos totales y evaluación de su perfil fitoquímico se realizó en el Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas en Chilpancingo de los Bravo, Gro. La evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos totales se realizó en el Laboratorio de Investigación en Microbiología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas Chilpancingo de los Bravo, Gro.

El presente estudio fue financiado a través del proyecto: Fortalecimiento del Posgrado en Biociencias, clave 249671 de los Fondos Mixtos CONACyT Gobierno del Estado de Guerrero. La tesista contó con beca CONACyT CVU 666408 durante un periodo de 14 meses.

## Agradecimientos

Agradezco profunda y sinceramente a todas aquellas personas que me apoyaron en la realización de este trabajo, principalmente a la Dra. Natividad Castro Alarcón, quien como Co-directora de tesis, me orientó y motivó durante el desarrollo de esta investigación, brindándome en todo momento su esfuerzo, tiempo y paciencia.

Hago un especial reconocimiento a la Dra. Patricia Álvarez Fitz, por su colaboración, sugerencias y propuestas que me permitieron avanzar con firmeza en cada una de las etapas de esta investigación.

Al Dr. Donaciano Pérez Castro por darme la oportunidad de conocer el asombroso mundo de las diatomeas marinas.

A la Dra. Jeiry Toribio Jiménez por todos sus consejos, correcciones y sugerencias que permitieron un evidente fortalecimiento de este proyecto.

A la Dra. Ma. Nieves Trujillo Tapia por el interés mostrado en este proyecto y apoyarme en las revisiones continuas del escrito.

Al auxiliar de laboratorio Víctor Alfonso Cervantes Urieta, por su amistad, tiempo y buena disposición de brindarme siempre su apoyo en este proceso.

## Dedicatorias

A mi hija Valeria Gómez Nájera, porque siempre será el motor que impulsa mi vida para lograr todas mis metas. Esto es para ti chiquita, para demostrarte que siempre trataré de ser mejor para ti, Te amo como todas las hojas de los árboles en el mundo.

A mis padres María Isabel Arce Hernández y Rufino Nájera Fajardo †, en demostración de mi amor e infinita gratitud a todo el apoyo que siempre me han dado. Gracias mamá por haber estado a mi lado siempre y apoyarme cuando más frustrada me sentía, por creer en mí y por el valor que me has demostrado para salir adelante pese a cualquier adversidad. A ti papá por inculcarme ejemplos de perseverancia y constancia que me han ayudado a ser la persona que soy, sé muy bien que estarías muy orgulloso de mi en este momento, Te extraño. No encuentro las palabras que expresen toda la admiración que siento por ustedes, Gracias.

A Baruch Estrada Bahena por ser mi compañero de vida y apoyarme en todo cuando más te necesité, esto también es para ti mi amor, porque escuchaste siempre con tolerancia mis inconformidades, me acompañaste en mis noches de desvelo y estuviste siempre pendiente de mi. Te amo demasiado.

A mi hermano Luis Gerardo Nájera Arce, por todo el interés que siempre muestras en lo que yo hago. Te amo nene.

A mi familia por darme tanto amor y estar siempre presentes en los momentos más importantes de mi vida. Con todo mi amor y respeto les agradezco por nunca dejarme sola, sinceramente les digo que esta meta cumplida es para ustedes.

Los amo a todos.

## ÍNDICE

1. Portada	1
2. Resumen	2
3. Abstract	3
4. Introducción	4
5. Materiales y Métodos	
5.1 Material biológico	6
5.2 Cinética de crecimiento y producción de biomasa	7
5.3 Obtención de extractos	8
5.4 Actividad antibacteriana	8
5.5 Perfil fitoquímico	10
5.6 Análisis estadístico	10
6. Resultados y Discusión	11
7. Tablas y Figuras	21
8. Referencias	28
9. Anexos	36

**Title: Antibacterial activity of three marine diatoms isolated from Acapulco, Guerrero, México.**

**Título: Actividad antibacteriana de tres diatomeas marinas aisladas de Acapulco, Guerrero, México.**

**Título corto: Actividad antibacteriana de diatomeas marinas.**

**Autores:**

Cynthia Nájera-Arce<sup>1</sup>

Patricia Alvarez-Fitz<sup>2</sup>

Natividad Castro-Alarcón<sup>1</sup>

Donaciano Pérez-Castro<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, Lázaro Cárdenas S/N Col. La Haciendita, Chilpancingo, Guerrero, México.

<sup>2</sup> Cátedras CONACyT - UAGro, Lázaro Cárdenas S/N Col. La Haciendita, Chilpancingo, Guerrero, México.

<sup>3</sup> Laboratorio de Biotecnología e Impacto Ambiental, Escuela Superior de Ciencias Ambientales de la Universidad Autónoma de Guerrero, Carretera Cayaco-Puerto Marques Ejido Llano Largo 56, 57 y 58, Acapulco, Guerrero, México.



## RESUMEN

Las diatomeas marinas tienen la capacidad de sintetizar y secretar una gran variedad de metabolitos secundarios con posibles aplicaciones en la industria farmacéutica, sin embargo su estudio aún es limitado. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue aislar y cultivar las especies *Chaetoceros curvisetus*, *Asterionella japonica* y *Biddulphia mobiliensis* de la Bahía Santa Lucía del Puerto de Acapulco, Guerrero, así como determinar la actividad antibacteriana y el perfil fitoquímico cualitativo de extractos totales obtenidos a partir de éstas contra bacterias de interés clínico. El rendimiento de biomasa fue de  $219,62 \pm 0,99$ ;  $151,12 \pm 1,41$  y  $109,04 \pm 1,48$  mg para *C. curvisetus*, *A. japonica* y *B. mobiliensis* respectivamente. Se obtuvieron tres extractos (hexano, diclorometano y acetona) para cada especie y mediante el perfil fitoquímico cualitativo se determinó que estas diatomeas marinas son ricas en aceites esenciales, alcaloides y terpenos. Así mismo la evaluación de la actividad antibacteriana demostró que el extracto de diclorometano de *C. curvisetus* fue el que presentó la mejor actividad con Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) entre 0,5 y 2 mg mL<sup>-1</sup> para bacterias tipo ATCC y de 8 y 16 mg mL<sup>-1</sup> para cepas de *E. coli* BLEE's<sup>+</sup>.

Palabras clave: *Chaetoceros curvisetus*, *Asterionella japonica*, *Biddulphia mobiliensis*, actividad antibacteriana, diatomeas.

## ABSTRACT

Marine diatoms have the capacity to synthesize and secrete a variety of secondary metabolites with possible applications in the pharmaceutical industry, however their study is still limited. Therefore, the objective of this work was to isolate and cultivate the species *Chaetoceros curvisetus*, *Asterionella japonica* and *Biddulphia mobiliensis* from the Bay of Santa Lucía in Acapulco, Guerrero, as well as to determine the antibacterial activity and the qualitative phytochemical profile of total extracts obtained from these against bacteria of clinical interest. The yield of biomass was  $219,62 \pm 0,99$ ;  $151,12 \pm 1,41$  and  $109,04 \pm 1,48$  mg for *C. curvisetus*, *A. japonica* and *B. mobiliensis* respectively. Three extracts (hexane, dichloromethane and acetone) were obtained for each species and with the qualitative phytochemical profile was determined that these marine diatoms are rich in essential oils, alkaloids and terpenes. The antibacterial activity showed that *C. curvisetus* extract has the best activity with minimum inhibitory concentrations (MIC) between 0,5 and 2 mg mL<sup>-1</sup> for ATCC bacterias and 8 and 16 mg mL<sup>-1</sup> for strains of *E. coli* BLEE's +.

Key words: *Chaetoceros curvisetus*, *Asterionella japonica*, *Biddulphia mobiliensis*, antibacterial activity, diatoms.

## INTRODUCCIÓN

Las diatomeas marinas son consideradas como fuentes renovables capaces de sintetizar, acumular y secretar una gran variedad de metabolitos estructuralmente nuevos y biológicamente activos como polisacáridos, policétidos, terpenoides, esteroides, ácidos grasos, compuestos fenólicos y pigmentos. Estos compuestos han despertado el interés de muchos investigadores debido a su actividad antimicrobiana, anticancerígena y antiinflamatoria (Gómez Luna 2007, Rodríguez-Meizoso *et al.* 2010, Jyotirmayee *et al.* 2014).

Se estima que en México existe un número de aproximadamente 5 000 especies de diatomeas marinas en aguas del Pacífico y Golfo de México (Hernández-Becerril 2014). En la Bahía Santa Lucía del Puerto de Acapulco, Guerrero se han aislado e identificado 88 géneros y 458 especies (Meave *et al.* 2012), de las cuales solo se tienen algunos estudios sobre la biodiversidad, distribución, taxonomía y variación temporal (Krayesky *et al.* 2009, Licea *et al.* 2011).

Dentro de las especies aisladas con mayor frecuencia se encuentran *Chaetoceros curvisetus* Cleve 1889 y *Asterionella japonica* Cleve & Möller 1882 (Meave *et al.* 2012, Rojas-Herrera *et al.* 2012, Moreno-Díaz *et al.* 2015), pero también se han identificado nuevas especies como *Biddulphia mobiliensis* Van Heurck 1882, de la cual hasta el momento no se tienen reportes en la literatura sobre su aislamiento, distribución y variación temporal en esta bahía.

*C. curvisetus*, es una diatomea céntrica caracterizada por poseer válvulas bipolares y estructuras denominadas setas las cuales tienen paredes celulares de sílice muy gruesas y se fusionan para formar cadenas largas y circulares que miden de 8 a 20  $\mu\text{m}$  de longitud (Lee & Lee 2011). Ha sido aislada en los meses de septiembre a enero con temperaturas entre 24 y 30 °C (Rojas-Herrera *et al.* 2012, Moreno-Díaz *et al.* 2015). Esta diatomea se ha utilizado ampliamente en la

acuicultura como suplemento alimenticio de crustáceos y peces de interés comercial (Sunesen *et al.* 2008). Wang *et al.* (2010), demostraron que *C. curvisetus* contiene una fracción lipídica y algunos ácidos grasos que le confieren actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*.

*A. japónica* es una diatomea pennada cuyas células heteropolares están unidas en colonias con forma de estrella de 160 µm de diámetro, representa el 90% de la población del fitoplancton marino (Round *et al.* 2007), y de acuerdo a Rojas-Herrera *et al.* (2012), se puede encontrar en diciembre a una temperatura de aproximadamente 25 °C. Se ha utilizado como un excelente indicador de la calidad del agua. (Pal & Choudhury 2014). Viso y colaboradores (1987) evidenciaron la actividad antimicrobiana de esta especie contra *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Sarcina sp.*, *Candida pseudotropicalis*, *Trichophyton rubrum* y *Fusarium fulvum*. Además se han aislado algunos compuestos como carotenoides (Gillan *et al.* 1983), glucolípidos (Pesando 1985) y ácidos grasos (Yongmanitchai & Ward 1989) a partir de ella.

*B. mobiliensis* es una diatomea céntrica formada por dos valvas con espinas que salen de los márgenes apicales y del centro de las mismas, mide 100 a 250 µm y posee numerosos cloroplastos periféricos así como un núcleo central (Round *et al.* 2007). Volkman *et al.* (1980), reportaron la presencia de esteroides y ácidos grasos en esta especie y de acuerdo a lo reportado por Walter & Mahesh (2000), presenta actividad antibacteriana frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.* y *Candida sp.*

La Bahía Santa Lucía es uno de los sitios turísticos más importantes de México, sin embargo se sabe poco sobre su riqueza fitoplanctónica y sus características biológicas, por lo que es importante realizar estudios que permitan aprovechar mejor este recurso natural. Con base en lo anterior la hipótesis de este trabajo es que los extractos totales de las diatomeas marinas *C. curvisetus*, *A. japónica* y *B. mobiliensis* poseen compuestos capaces de inhibir el crecimiento bacteriano, y por tal motivo el objetivo de este estudio fue aislar y cultivar estas especies a partir de clones de muestras planctónicas de la Bahía Santa Lucía del Puerto de Acapulco, Gro. México, con la finalidad de determinar el perfil fitoquímico cualitativo y evaluar la actividad antibacteriana de extractos totales obtenidos de éstas contra bacterias Gram positivas y Gram negativas de interés clínico, y así contribuir a futuras investigaciones en el área farmacéutica que beneficien la salud humana.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Material biológico.***

Se colectaron 100 muestras planctónicas (120 mL) en la Bahía Santa Lucía del Puerto de Acapulco (16°49' latitud Norte y 99°45' latitud Oeste), en los meses de diciembre de 2015 a marzo de 2016, utilizando una red de plancton (tipo cono truncado de 1 m de largo, 50 cm de diámetro de boca y 54 µm de abertura de poro) realizando un arrastre superficial circular durante 3 min a una profundidad de 30 cm. La identificación de las especies se realizó con un microscopio óptico binocular (Leica, 1349521X, Buffalo, N.Y., USA) utilizando los objetivos 10x y 40x y las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (Microscopio Electrónico de Barrido Jeol T300) con base en las características morfológicas reportadas por

Round *et al.* (2007). Para el aislamiento de las células se empleó el método de pipeta descrito por Andersen (2005).

### ***Cinética de crecimiento y producción de biomasa.***

Se realizaron cultivos monoespecíficos, manteniendo las siguientes condiciones: medio de cultivo F/2 (Sigma-Aldrich® St. Louis, USA) en agua marina estéril a una concentración de 4 mL L<sup>-1</sup>, temperatura constante de 25 ± 0,5 °C, pH de 7.9, salinidad de 30-32 unidades prácticas de salinidad (ups) y un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad (Guillard 1973). Para monitorear el crecimiento celular se realizaron conteos diarios siguiendo la técnica de conteo en cámara de Neubauer, la densidad celular y los parámetros poblacionales se obtuvieron a partir de las siguientes fórmulas (Karlson *et al.* 2010):

$$\text{Densidad celular (células ml}^{-1}\text{)} = (\text{No. de células totales} / \text{No. de cuadros contados}) * 100 \text{ }^{(1)}$$

$$\text{Velocidad de crecimiento (K)} = (\ln C_f - \ln C_i) / (t_f - t_i) \text{ }^{(2)}$$

$$\text{Tiempo de duplicación (TD)} = \ln 2 / K \text{ }^{(3)}$$

$$\text{Producción diaria (PD)} = (C_f - C_i) / (t_f - t_i) \text{ }^{(4)}$$

Dónde:

Ci: Concentración inicial

Cf: Concentración del cultivo al final de la fase exponencial

t<sub>f</sub> – t<sub>i</sub>: Duración de la fase exponencial en días

ln: Logaritmo natural

La biomasa se recuperó por filtración utilizando un embudo buchner con papel filtro de 1  $\mu\text{m}$  de poro en una bomba de vacío, se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 h y fue pesada con una balanza analítica (Adventurer™ Pro AV114C OHAUS Corporation, USA).

#### ***Obtención de extractos.***

A partir de la biomasa obtenida se realizaron extracciones mediante el método de maceración con disolventes orgánicos de distinta polaridad (hexano, diclorometano y acetona) durante 24 h. Para evaporar los disolventes se utilizó un rotavapor (Digital 410 Puebla, México) a 70 rpm y 50 °C. Este procedimiento se realizó dos veces para cada uno de los disolventes y se obtuvo el porcentaje de rendimiento en base al total de biomasa obtenida (mg) (Lima-Filho *et al.* 2002).

#### ***Actividad antibacteriana.***

Se realizó un screening para determinar la actividad biológica de los extractos mediante el método bioautográfico, para lo cual se prepararon dos cromatoplasmas de sílica gel (No. 60 Merck) de 5 x 3 cm, sobre el punto de aplicación se colocaron los extractos y fueron eluidos en un sistema hexano: acetona (7:3), una de las cromatoplasmas sirvió como control para la localización de los compuestos, siendo analizada bajo luz ultravioleta (302 y 365 nm) y revelada con revelador ácido (10% ácido sulfúrico, 90% agua). La segunda cromatoplasma fue sumergida en una suspensión de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ajustado al estándar 0,5 de Mc Farland ( $1-2 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) durante 30 s y se incubó a 37 °C durante 24 h en cámara húmeda. Transcurrido el tiempo de incubación el cromatograma se roció con una capa ligera y homogénea de una solución acuosa de cloruro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil-2H-

bromido-tetrazolium (MTT, Merk®, 3 mg/10 mL de agua destilada) como colorante vital y se incubó a 37 °C durante 30 min. La actividad antibacteriana se interpretó como manchas blancas o zonas de inhibición del crecimiento bacteriano en un fondo violeta (Ríos *et al.* 1988).

La actividad antibacteriana se determinó por el método de microdilución utilizando las siguientes cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus sciuri* ATCC 29061, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus caseofluvialis* ATCC 700327, *Enterobacter cloacae* ATCC 700323, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y *Salmonella dublin* NTCC 9676 estandarizadas al 0,5 de Mc Farland ( $1-2 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>). Los extractos fueron diluidos con dimetilsulfóxido (DMSO, 200 µL) y agua (800 µL) y se evaluaron a concentraciones de 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 mg mL<sup>-1</sup> en microplacas de 96 pozos de fondo plano en donde se colocaron 100 µL de caldo Luria Bertani (LB) y diluciones seriadas de los extractos. Se inocularon 2 µL de cepas bacterianas y se incubaron a 37 °C por 24 h. Se usó ceftazidima (10 µg mL<sup>-1</sup>) como control positivo. La placa fue leída utilizando el equipo Multiskan GO ThermoScientific (Vantaa, Finland) ajustado a 600 nm y analizado con el software SkanIt Software 4.1. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la cual se define como la concentración más baja en la que el producto natural o extracto inhibe el crecimiento bacteriano (Andrews 2001). Se consideraron activos todos los extractos con concentraciones menores a 8 mg mL<sup>-1</sup>. Los experimentos fueron realizados por duplicado.

El extracto que presentó las CMI mas bajas fue probado contra aislados clínicos productores de β lactamasas de espectro extendido (BLEE's<sup>+</sup>): *Escherichia coli* 2578, *Escherichia coli* 4036,



*Escherichia coli* 4012 y *Escherichia coli* 2149 y *Staphylococcus* coagulasa negativos resistentes a meticilina (SCN-RM): *Staphylococcus epidermidis* 1042, *haemolitycus* 562, *Staphylococcus haemolitycus* 731, *Staphylococcus haemolitycus* 1036, y *Staphylococcus simulans* 1050, usando como controles a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y *Staphylococcus aureus* ATCC 01198, con la metodología descrita anteriormente.

### ***Perfil fitoquímico.***

El perfil fitoquímico se realizó mediante cromatografía en capa fina (CCF) de acuerdo a las especificaciones del método bioautográfico (Ríos *et al.* 1988). Las cromatoplasmas fueron analizadas bajo una lámpara de luz ultravioleta (302 y 365 nm) y se revelaron de acuerdo a lo reportado por Wagner *et al.* (2001) para alcaloides (Reactivo Dragendorff), flavonoides (Vainillina-ácido clorhídrico), triterpenos (Reactivo de Liebermann-Burchard), aceites esenciales (Vainillina- ácido sulfúrico), lignanos (Vainillina-ácido fosfórico), quinonas y cumarinas (Hidróxido de potasio) y saponinas (Prueba de espuma).

### **Análisis estadístico**

Todos los resultados se analizaron realizando comparaciones de medias mediante las pruebas de análisis de varianza (ANOVA) y Tukey, utilizando el programa IBM SPSS Statistics 19 con valores  $P < 0.05$  para determinar diferencias estadísticas significativas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las especies de diatomeas marinas utilizadas en este estudio fueron identificadas con base en la estructura y ornamentación de los frústulos propuesta por Round *et al.* (2007) y las características morfológicas observadas tanto por microscopio óptico como por microscopía electrónica de barrido. *C. curvisetus* se caracterizó por presentar espinas terminales no bifurcadas dirigidas hacia el exterior de la curvatura (22,77  $\mu\text{m}$ ) característica de esta especie, presentando un solo plástido, aberturas ovales entre las uniones adyacentes y valvas de forma oval (4,41 x 4,41  $\mu\text{m}$ ), se encontraron células individuales y cadenas de 2 a 13 células (Fig. 1A panel I y II). Resultados similares han sido reportados por Sunesen *et al.* (2008), Ishii *et al.* (2011) y Meave *et al.* (2012).

Para la especie *A. japónica* se observaron colonias en espiral semejando la forma de una estrella con diámetro de 85  $\mu\text{m}$  formadas por 10 células (8,42 x 6,55  $\mu\text{m}$ ) de base semitriangular con dos plástidos en su interior, cada célula presentó un ápice largo ligeramente grueso (26,2  $\mu\text{m}$  de longitud) (Fig. 1B, panel I y II). Estas características fueron reportadas también por Sunesen & Sar (2007).

Se identificó a *B. mobiliensis* por sus células oblongas (170 x 50  $\mu\text{m}$ ) unidas entre sí por espinas centrales largas ligeramente curvadas, presentó prolongaciones marginales cortas, numerosos plástidos, valvas elípticas convexas y numerosas espinas dispersas en el margen (Fig. 1C panel I y II). Tal como lo describen Ojeda (2011) y Lavigne *et al.* (2015). Hasta el momento no se han encontrado registros sobre el aislamiento de esta especie en la bahía Santa Lucía de Acapulco, siendo esta la primera vez que se reporta su presencia. No obstante, Meave *et al.* (2012) identificaron otras especies de *Biddulphia* (*B. alternans*, *B. biddulphiana* y *B. tridens*), lo que indica que es un género presente en esta zona costera y de acuerdo a lo reportado por Alves-de

Souza *et al.* (2008) la presencia de nuevas especies está directamente relacionada a las condiciones ambientales como temperatura, luz, concentración de nutrientes y patrones de circulación del agua.

En cuanto a la evaluación de los parámetros cinéticos y poblacionales de *C. curvisetus*, *A. japonica* y *B. mobiliensis*, mostraron que las tres especies poseen una cinética de crecimiento de tipo sigmoidea (Fig.2). La especie que presentó los mejores parámetros poblacionales estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ) fue *C. curvisetus* con una densidad celular mayor ( $4,6 \times 10^4$  células/mL) en un menor tiempo de duplicación ( $1,12 \pm 0,02$  días (d)) con una producción diaria de  $8746,67 \pm 70,56$  células mL<sup>-1</sup>, en comparación con las otras dos especies (Tabla 1) a pesar de tener una velocidad de crecimiento menor ( $0,62 \pm 0,01$  d). Esto podría atribuirse a una mejor adaptación fisiológica de esta especie, como el aumento de los niveles de enzimas y metabolitos involucrados en la división celular y la fijación de carbono (Lavens & Sorgeloos 1996), sin embargo los valores son menores a lo reportado por Karthikeyan *et al.*, (2013) en cuanto a la densidad celular ( $7,16 \times 10^4$  células mL<sup>-1</sup>), diferencia que puede relacionarse principalmente a que los autores modificaron las concentraciones de los nutrientes con el fin de incrementar intencionalmente la producción celular.

En la especie *A. japonica* la densidad celular ( $3,2 \times 10^4$  células mL<sup>-1</sup>) es mayor a la reportada por Kain & Fogg (1958) ( $2,5 \times 10^3$  células mL<sup>-1</sup>) y no se han encontrado reportes sobre la especie *B. mobiliensis*, sin embargo la densidad celular ( $6,9 \times 10^3$  células mL<sup>-1</sup>) fue menor en comparación a la de *C. curvisetus* y *A. japónica* de este estudio.

Hasta el momento no se tienen antecedentes específicos que aborden otros parámetros cinéticos como la velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y producción diaria de las tres especies estudiadas, sin embargo existen estudios que evalúan algunos de estos parámetros en otras

especies con fines distintos, como en el caso de *Chaetoceros muelleri*, que de acuerdo a lo reportado por Medina-Reyna & Cordero-Esquivel (1998), presenta una densidad celular de  $4,05 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> a los 5 días de cultivo con una velocidad de crecimiento de 1,31 d, así como *Chaetoceros gracilis* que presentó una densidad celular de  $6,76 \times 10^4$  células mL<sup>-1</sup> en 8 d de cultivo con un tiempo de duplicación de 0,038 d y una velocidad de crecimiento de 0,5 – 3,17 d (Costa *et al.* 1999), siendo valores mayores a lo reportado en este estudio en comparación a la especie *C. curvisetus*. De la misma manera, López *et al.* (2004) realizaron una comparación de la producción comercial de *Chaetoceros sp.* en dónde se alcanzaron densidades celulares de entre  $0,9$  y  $1,5 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> y producciones de biomasa de 9 a 34 g L<sup>-1</sup> bajo condiciones de cultivo semicontroladas y a diferentes concentraciones de nutrientes.

Así mismo, *Asterionella formosa* fue evaluada por Tilman & Soltan (1976) que modificaron las concentraciones de fosfatos y silicatos, con lo cual obtuvieron un rendimiento de  $2,2 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> con un tiempo de duplicación de 0,88 d. Por otra parte, Xia *et al.* (2013) realizaron cultivos de *Biddulphia aurita* obteniendo una producción de 4 g L<sup>-1</sup> en 10 días modificando la concentración de nitrógeno y la intensidad de luz.

Todas estas variaciones entre las diferentes especies se deben al estrés al que son sometidas las células al ser transferidas a un medio distinto al natural, así como las diferentes condiciones de crecimiento como temperatura, pH, intensidad de luz y las diferentes concentraciones de nutrientes (Hernández-Pérez & Labbé 2014). Además se ha demostrado que el crecimiento de las microalgas y/o diatomeas se ve afectado por la fuente de nitrógeno, dado que modulan el transporte y asimilación de nutrientes necesarios para los procesos metabólicos (Matos Moura *et al.* 2007). Iriarte *et al.* (2007) afirman que las formas de nitrógeno reducido (amonio y urea) promueven una mayor biosíntesis de los nutrientes sobre las formas más oxidadas. No obstante, se ha demostrado que la manipulación de las condiciones de crecimiento como la concentración

de nutrientes, tiempos de incubación, pH, temperatura y otras, tienen un impacto directo en la cantidad y diversidad de la producción de metabolitos secundarios (Demain 2000, Bode *et al.* 2002).

En cuanto a la cantidad de biomasa obtenida, la especie con mayor producción fue *C. curvisetus* ( $219,62 \pm 0,99 \text{ mg L}^{-1}$ ), seguida de *A. japonica* ( $151,12 \pm 1,41 \text{ mg L}^{-1}$ ) y *B. mobiliensis* ( $109,04 \pm 1,48 \text{ mg L}^{-1}$ ) en las condiciones probadas. La extracción de biomasa en cada experimento se realizó al inicio de la fase estacionaria, es decir a los 4, 5 y 6 días de cultivo respectivamente, donde además se obtuvieron los mayores rendimientos (Tabla 1), y de acuerdo a Roze *et al.* (2011), los metabolitos secundarios son producidos mayoritariamente durante la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria.

Los porcentajes de rendimiento de los tres extractos (hexano, diclorometano y acetona) obtenidos de cada una de las especies se muestran en la Tabla 2, se aprecia que el rendimiento de los extractos de diclorometano y acetona de *B. mobiliensis* fueron mayores y estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ) en comparación a los obtenidos para *C. curvisetus* y *A. japonica*. La diferencia en el porcentaje de rendimiento se debe al tipo de disolvente utilizado (Ncube *et al.* 2008) ya que éstos extraen compuestos de distintos pesos moleculares dependiendo de su estructura química, por ejemplo, los compuestos polifenólicos tienen mayor solubilidad en disolventes polares como la acetona, pero además estos compuestos se dividen en varias clases de acuerdo con el número de anillos aromáticos que contienen, tales como los flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos que a su vez tienen pesos moleculares distintos, lo cual se ve reflejado en el peso final del extracto (Harborne & Williams 2000).

En cuanto a la actividad antibacteriana de los extractos, la CMI se muestra en la tabla 3, destacando el extracto de diclorometano de *C. curvisetus* que presentó una actividad contra bacterias ATCC Gram positivas y Gram negativas en concentraciones de 0,5 a 2 mg mL<sup>-1</sup>. Estos resultados son similares a los reportados por Wang *et al.* (2010), que evidenciaron la actividad antibacteriana de un extracto obtenido con éter de petróleo para *Staphylococcus aureus* (25 mg mL<sup>-1</sup>), *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Proteus vulgaris* (12 mg mL<sup>-1</sup>) siendo concentraciones más elevadas a nuestro estudio. Además, se han realizado estudios sobre la actividad antibacteriana en otras especies de *Chaetoceros sp*, como lo reportado por Sánchez-Saavedra *et al.* (2010) de un extracto metanólico de *C. muelleri*, con actividad contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, además Sushanth & Rajashekhar, (2015) determinaron la actividad antibacteriana de extractos etanólico, metanólico y hexánico de *C. calcitrans* contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Bacillus subtilis*.

En este estudio el extracto con mayor actividad antibacteriana de *A. japónica* fue el de acetona con CMI de 4 mg mL<sup>-1</sup> para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y de 8 mg mL<sup>-1</sup> para *Staphylococcus sciuri* ATCC 29061 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Esto es similar a lo reportado por Viso *et al.* (1987) que demostraron la actividad de *A. japonica* contra *Micrococcus luteus*, *Sarcina sp.* y *Staphylococcus aureus*. Así mismo Gauthier (1969), demostró actividad antimicrobiana de *Asterionella notata*, contra levaduras y hongos filamentosos (*Candida albicans*, *Penicillium sp.* y *Aspergillus genus*).

El extracto de acetona de *B. mobiliensis*, mostró una mayor actividad contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 en concentraciones de 0,5 mg mL<sup>-1</sup>, coincidiendo a lo reportado por Walter & Mahesh (2000),

que determinaron la actividad antibacteriana de un extracto de acetona contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi* y *Salmonella typhi*.

Sin embargo, todos los autores antes mencionados realizaron la evaluación de la actividad antibacteriana mediante el método de difusión en disco y por lo tanto los resultados no son totalmente comparables.

Es posible que el espectro de actividad de los extractos evaluados se deba al tipo de metabolitos secundarios, y su concentración, presentes en cada uno de ellos, esto se demostró en el perfil fitoquímico dónde la presencia de aceites esenciales fue visualizada en todos los extractos (Tabla 4), que de acuerdo a Desbois *et al.* (2009), presentan actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, por la capacidad de romper la membrana celular bacteriana. Los aceites esenciales básicamente están compuestos por terpenoides (Mitäe-Äulafia *et al.* 2005), siendo los sesquiterpenoides y meroterpenoides los que se obtienen con mayor frecuencia de diatomeas marinas (Abad *et al.* 2011, Jyotirmayee *et al.* 2014). El mecanismo de acción de los terpenoides está dado por el aumento en la permeabilidad de la membrana de las células bacterianas (Griffin 2000). Los ácidos grasos (monoinsaturados y poliinsaturados) también se incluyen entre los aceites esenciales y son producidos por diferentes diatomeas (Lebeau & Robert 2003). Los poliinsaturados se han obtenido con mayor frecuencia de *Nitzschia alba* (Lee 1997), *Phaeodactylum tricornutum* (Robles-Medina *et al.* 1999), *Skeletonema costatum* (Blanchemain & Grizeau 1999) y específicamente de *C. calcitrans* (Serval *et al.* 1994), *C. gracilis* (Pratiwi *et al.* 2009), *C. muelleri* (Pacheco-Vega *et al.* 2010), *C. baculites*, *C. anastomosans* y *C. affinis* (Fuad *et al.* 2015). Por este motivo es probable que algunos tipos de ácidos grasos poliinsaturados estén presentes en el extracto total de *C. curvisetus* y sean estos los responsables de la actividad antibacteriana.

El perfil fitoquímico reveló también que todos los extractos de acetona presentaron saponinas (Tabla 4). Las saponinas son glúcidos que tienen la capacidad de formar complejos con el colesterol presente en las membranas celulares y producir grandes poros en las mismas, alterando la permeabilidad y morfología de la célula microbiana (Díaz Puentes 2009) pero además, en las bacterias Gram negativas cuyas paredes celulares carecen de colesterol pero están cubiertas por lipopolisacáridos en un 90%, las saponinas tienen la capacidad de interactuar con el lípido A y así aumentar la permeabilidad de la pared celular bacteriana (Arabski *et al.* 2009) por lo que se sugiere que la actividad antibacteriana del extracto de acetona de *B. mobilisens*, que presentó los valores de CMI menores contra bacterias ATCC Gram negativas, probablemente esté dada por algún tipo de saponinas.

También se encontraron compuestos fenólicos como las quinonas, cumarinas y flavonoides en los extractos evaluados (Tabla 4), los cuales presentan actividad antibacteriana como resultado de la unión a adhesinas, inhibición enzimática, incremento de la permeabilidad, rompimiento de membrana celular, eliminación del sustrato, disipación del potencial de membrana, entre otros mecanismos (Amaro *et al.* 2011). Así como los terpenos cuya actividad antimicrobiana se ha asociado con la disrupción de la membrana celular bacteriana (Saleem *et al.* 2010) y los alcaloides, que son compuestos que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos debido a su capacidad de intercalarse con el DNA, de detener la síntesis de proteínas, inducir la apoptosis e inhibir las enzimas del metabolismo de carbohidratos (Sepúlveda-Jiménez *et al.* 2003).

Sin embargo, es importante mencionar que la actividad antibacteriana observada en los extractos de diclorometano de *C. curvisetus* así como los extractos de acetona de *A. japonica* y *B. mobilisens* puede deberse a un efecto sinérgico entre los distintos compuestos y no a uno en



particular y además estar relacionada a la presencia de más de un compuesto activo y la concentración de éstos en cada extracto (Coronado *et al.* 2015).

Debido a que el extracto de diclorometano de *C. curvisetus* mostró una mayor actividad antibacteriana, se evaluó frente aislados clínicos BLEE's<sup>+</sup> y SCN-RM (Tabla 5) demostrando tener actividad antibacteriana contra *K. pneumoniae* ATCC 700603 BLEE<sup>+</sup> (2 mg mL<sup>-1</sup>), *Escherichia coli* 2578 BLEE's<sup>+</sup> (8 mg mL<sup>-1</sup>) y *Staphylococcus aureus* ATCC 01198 RM (4 mg mL<sup>-1</sup>). Esto es de gran importancia ya que las infecciones causadas por bacterias productoras de BLEE's y RM son un problema mundial que incrementa la morbilidad y mortalidad de los pacientes hospitalizados y en pacientes en la comunidad, teniendo una prevalencia del 33,3 % y 52 % respectivamente, en aislados clínicos en México (Mejía *et al.* 2010, Gales *et al.* 2012) predominando las especie *Escherichia coli* como agente patógeno de infecciones del tracto urinario (Navarro-Navarro *et al.* 2011, Morones-Esquivel *et al.* 2016), *Staphylococcus aureus* en infecciones sistémicas, de piel y tejidos blandos (Bustos-Martinez *et al.* 2006, Miranda Novales 2011) y *Klebsiella pneumoniae* en bacteriemias nosocomiales (Silva *et al.* 2001, Andrade *et al.* 2004) por lo que se hace necesario identificar nuevos compuestos que permitan disminuir esta problemática.

A pesar de que el extracto de diclorometano mostró buena actividad contra bacterias ATCC ésta se vio disminuida frente a aislados clínicos (Tablas 3 y 5), la diferencia se debe principalmente a los mecanismos de resistencia presentes en los aislados clínicos, ya que las BLEE's son enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico de antibióticos como penicilinas y cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación (Paterson & Bonomo 2005) y las bacterias RM han generado una variación genética, codificada en el gen *mecA*, por medio del cual modifican la estructura de su proteína ligadora a penicilina (PBP2a) lo que impide que la meticilina pueda

adherirse al lugar donde va a ejercer la acción bactericida (Louis & Rice 2006). Aunado a esto, los aislados clínicos utilizados poseen un perfil de resistencia más complejo (datos no reportados) y se ha demostrado que tanto el grupo filogenético, los factores y número de genes de virulencia incrementan la multirresistencia de estas cepas (Miranda-Estrada *et al.* 2016) a diferencia de las cepas ATCC, las cuales en su mayoría son sensibles a antimicrobianos. Una alternativa para incrementar la actividad antibacteriana en aislados clínicos sería evaluar la sinergia del extracto de diclorometano de *C. curvisetus* y antibióticos comerciales con la finalidad de promover su absorción y potenciar la actividad de estos últimos.

En conclusión las especies *C. curvisetus*, *A. japonica* y *B. mobiliensis* pueden cultivarse en medio F/2 Guillard bajo condiciones in vitro favoreciendo la producción de biomasa, siendo este el primer reporte de los parámetros cinéticos de estas diatomeas marinas sin modificaciones en el medio de cultivo. Todos los extractos evaluados presentaron actividad antibacteriana, sin embargo el extracto de diclorometano de *C. curvisetus* fue el que mostró una mayor actividad frente a bacterias ATCC Gram positivas y Gram negativas, así como aislados clínicos BLEE's<sup>+</sup>. Sin embargo el extracto de acetona de *B. mobiliensis* mostró la mejor actividad frente a bacterias Gram negativas.

Por lo anterior se demuestra que estas diatomeas marinas representan una importante fuente de compuestos naturales a los cuales puede atribuirse su actividad biológica antibacteriana y que pueden ser utilizados tanto en la industria farmacéutica como en otros tipos de industria biotecnológica.

## **Agradecimientos**

El presente estudio fue financiado a través del fondo para el Fortalecimiento del Posgrado en Biociencias, clave 249671 de los Fondos Mixtos CONACyT Gobierno del Estado de Guerrero.

La autora contó con beca CONACyT CVU 666408. Se agradece a la MC. Jazmín López Díaz por la toma de las micrografías en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido y Microanálisis (LMEByM) y al C. Victor Alfonso Cervantes Urieta, auxiliar del Laboratorio de Biotecnología e Impacto Ambiental.

Todos los autores del trabajo refieren no tener conflictos de intereses.

TABLAS Y FIGURAS

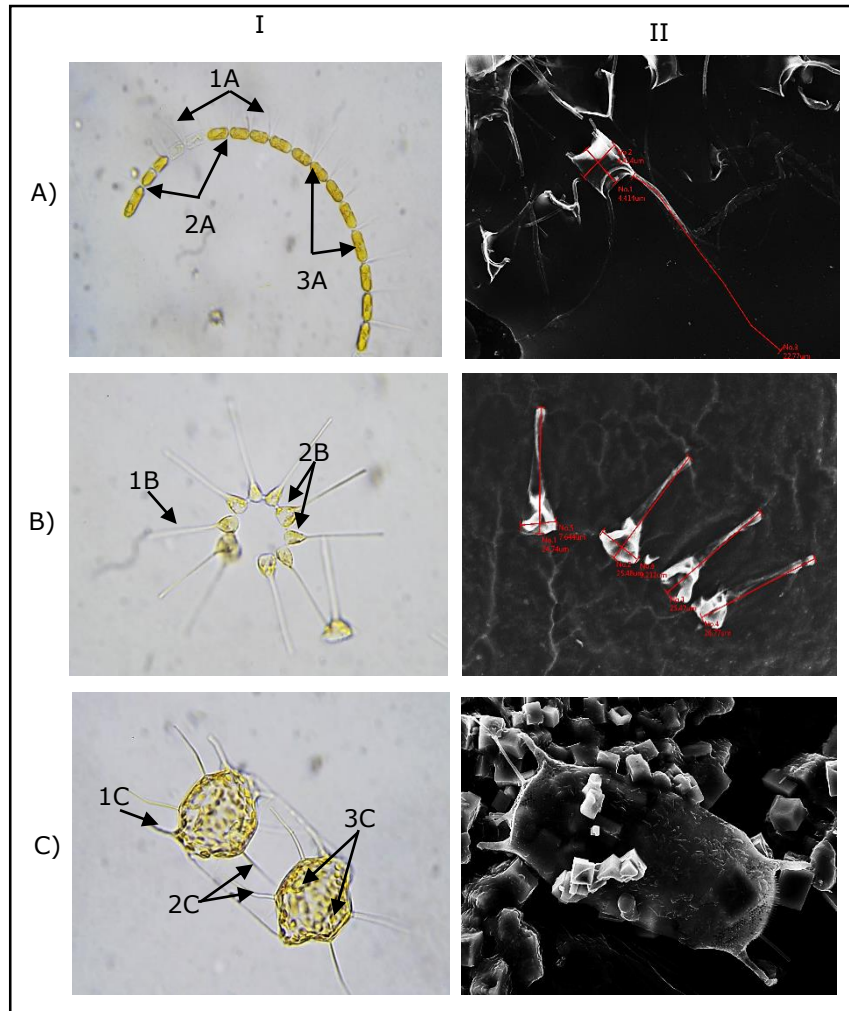


Fig. 1 Imágenes de A) *Chaetoceros curvisetus* (1A espinas no bifurcadas, 2A uniones adyacentes, 3c plástidos), B) *Asterionella japonica* (1B ápice, 2B plástidos) y C) *Biddulphia mobiliensis* (1C prolongaciones marginales, 2B espinas centrales, 3C plástidos). I) Tinción: Lugol. Tomadas en objetivo 40x. II) Imágenes de microscopía electrónica de barrido. / Images of A) *Chaetoceros curvisetus* (1A nonbifurcated spines, 2A adjacent junctions, 3c plastids), B) *Asterionella japonica* (1B apex, 2B plastids) and C) *Biddulphia mobiliensis* (1C marginal extensions, 2B central spines, 3C plastids). I) Staining: Lugol. Taken on 40x lens. II) Scanning electron microscopy images.

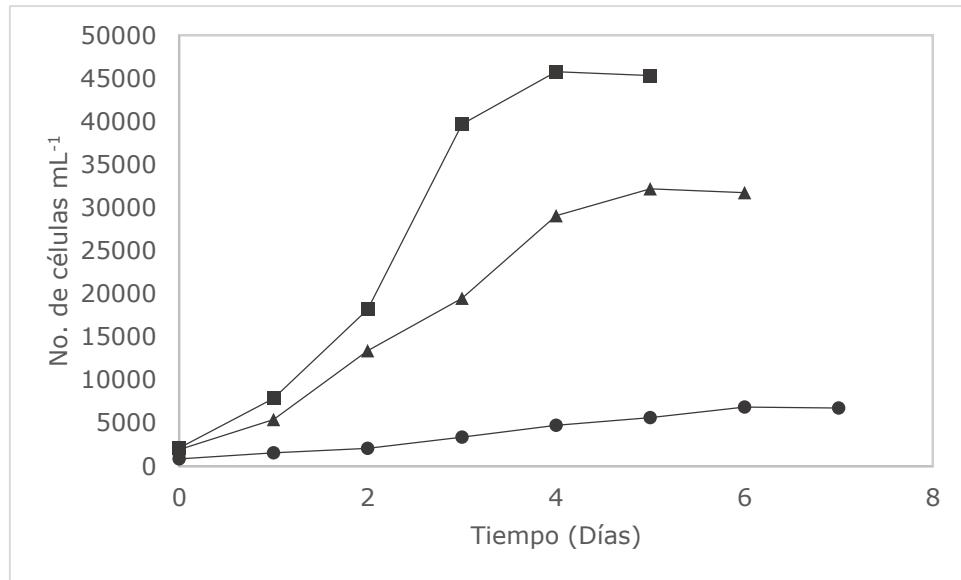


Fig. 2 Curvas de crecimiento de ■ *Chaetoceros curvisetus*, ▲ *Asterionella japonica* y ● *Biddulphia mobiliensis* / Growth curves of ■ *Chaetoceros curvisetus*, ▲ *Asterionella japonica* y ● *Biddulphia mobiliensis*.

Tabla 1. Parámetros poblacionales de diatomeas marinas y cantidad de biomasa obtenida en base seca (b.s) ± DE. / Population parameters of marine diatoms and amount of biomass obtained on dry basis ± SD

Especie	Densidad celular (células mL <sup>-1</sup> )	Parámetros poblacionales			Biomasa (mg L <sup>-1</sup> )
		K (d)	TD (d)	PD (células mL <sup>-1</sup> )	
<i>Chaetoceros curvisetus</i>	4,6 ± 0,54 x 10 <sup>4</sup> a	0,62 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,12 ± 0,02 <sup>c</sup>	8746,67 ± 70,56 <sup>a</sup>	219,62 ± 0,99 <sup>a</sup>
<i>Asterionella japónica</i>	3,2 ± 0,55 x 10 <sup>4</sup> b	0,47 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,48 ± 0,04 <sup>b</sup>	5005,56 ± 44,10 <sup>b</sup>	109,04 ± 1,48 <sup>c</sup>
<i>Biddulphia mobiliensis</i>	6,9 ± 0,35 x 10 <sup>3</sup> c	0,40 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,73 ± 0,05 <sup>a</sup>	844,44 ± 1,84 <sup>c</sup>	151,12 ± 1,41 <sup>b</sup>

K = Velocidad de crecimiento, TD = Tiempo de duplicación y PD = Producción diaria, d = días, valores a,b y c indican diferencias estadísticas (ANOVA y prueba a posterior de Tukey,  $P < 0,05$ : a>b>c) / K = Growth rate, TD = Time of duplication and PD = Daily production, d = days, values a, b and c indicate statistical differences (ANOVA and Tukey test,  $P < 0,05$ : a> b> c).

Tabla 2. Rendimiento de los extractos totales de diatomeas marinas / Yield of total extracts of marine diatoms.

Diatomea	mg de extracto obtenido $\pm$ DE (%)		
	hexano	diclorometano	acetona
<i>Chaetoceros curvisetus</i>	38,1 $\pm$ 0,69 (0,83) <sup>b</sup>	205,8 $\pm$ 0,51 (4,46) <sup>b</sup>	230,9 $\pm$ 0,63 (5,01) <sup>b</sup>
<i>Asterionella japonica</i>	47,5 $\pm$ 1,03 (2,07) <sup>a</sup>	127,7 $\pm$ 0,68 (5,58) <sup>c</sup>	195,3 $\pm$ 0,55 (8,53) <sup>c</sup>
<i>Biddulphia mobiliensis</i>	46,3 $\pm$ 0,31 (2,02) <sup>a</sup>	235,7 $\pm$ 0,68 (10,29) <sup>a</sup>	286,1 $\pm$ 0,90 (9,01) <sup>a</sup>

Valores a,b y c indican diferencias estadísticas (ANOVA y prueba a posterior de Tukey,  $P < 0,05$ : a>b>c) / Values a, b and c indicate statistical differences (ANOVA and Tukey test,  $P < 0,05$ : a> b> c).

Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos totales de *C. curvisetus*, *A. japónica* y *B. mobiliensis*  
 Minimum / Inhibitory Concentration (MIC) of the total extracts of *C. curvisetus*, *A. japonica* and *B. mobiliensis*.

Bacterias tipo ATCC	CMI (mg mL <sup>-1</sup> )								
	<i>Chaetoceros curvisetus</i>			<i>Asterionella japonica</i>			<i>Biddulphia mobiliensis</i>		
	H	D	A	H	D	A	H	D	A
Control negativo *	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control negativo**	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control positivo***	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Gram positivas									
<i>Staphylococcus aureus</i> 29213	32	0,5	8	32	32	4	32	32	8
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	^	1	^	32	^	^	^	32	^
<i>Staphylococcus sciuri</i> 29061	^	2	16	32	^	8	32	32	16
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	4	2	16	^	32	^	2	2	^
<i>Enterococcus caseofluvialis</i> 700327	^	2	^	2	2	^	^	^	^
Gram negativas									
<i>Escherichia coli</i> 25922	^	2	2	32	32	8	32	32	0,5
<i>Pseudomona aeruginosa</i> 27853	^	0,5	16	32	32	4	32	32	0,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 700603	^	2	16	^	2	16	32	32	0,5
<i>Enterobacter cloacae</i> 700323	^	2	^	^	32	^	^	^	^
<i>Salmonella dublin</i> 9676	2	2	16	2	32	^	32	32	^

H = Extracto de hexano, D = Extracto de diclorometano, A = Extracto de acetona, ^ = CMI >32 mg mL<sup>-1</sup>, + = Crecimiento,  
 \*=Bacterias, \*\*= Bacterias + DMSO, \*\*\*= Cefotaxima µm mL<sup>-1</sup> / H = hexane extract, D = dichloromethane extract, A = acetone  
 extract, ^ = MIC >32 mg mL<sup>-1</sup>, + = Growth, \* = Bacteria, \*\* = Bacteria + DMSO, \*\*\* = Cefotaxime µm mL<sup>-1</sup>.



Tabla 4. Perfil fitoquímico cualitativo de *C. curvisetus*, *A. japonica* y *B. mobiliensis* realizado por Cromatografía en Capa Fina (CCF) de los extractos totales / Qualitative phytochemical profile of *C. curvisetus*, *A. japonica* and *B. mobiliensis* by thin layer chromatography (TLC) of the total extracts.

Compuestos	<i>C. curvisetus</i>			<i>A. japonica</i>			<i>B. mobiliensis</i>		
	H	D	A	H	D	A	H	D	A
Saponinas	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Lignanos	+	-	-	-	-	-	+	-	+
Cumarinas	+	+	-	+	+	-	+	-	-
Flavonoides	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Triterpenos	+	+	-	+	+	-	+	+	-
Quinonas	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Alcaloides	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Aceites esenciales	+	+	+	+	+	+	+	+	+

H = extracto de hexano, D = extracto de diclorometano y A= extracto de acetona + = presencia, - = ausencia / H = hexane extract, D = dichloromethane extract and A = acetone extract, + = presence, - = absence.

Tabla 5. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto de diclorometano de *C. curvisetus* contra aislados clínicos productores de  $\beta$  lactamasas de espectro extendido (BLEE<sup>s+</sup>) y *Staphylococcus* coagulasa negativo resistentes a meticilina (SCN-RM) / Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the *C. curvisetus* dichloromethane extract in clinical isolates of extended spectrum  $\beta$  lactamases (BLEE<sup>+</sup>) and methicillin resistant negative coagulase *Staphylococcus* (MR-SCN).

Microorganismos	CMI (mg mL <sup>-1</sup> )	Microorganismos	CMI (mg mL <sup>-1</sup> )
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	2	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 01198	4
<i>Escherichia coli</i> 2578 BLEE <sup>+</sup>	8	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 1042 MR	32
<i>Escherichia coli</i> 4036 BLEE <sup>+</sup>	16	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 562 MR	32
<i>Escherichia coli</i> 4012 BLEE <sup>+</sup>	^	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 731 MR	^
<i>Escherichia coli</i> 2149 BLEE <sup>+</sup>	^	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 1036 MR	^
		<i>Staphylococcus simulans</i> 1050 MR	^

^ = CMI >32 mg mL<sup>-1</sup>

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad MJ, Bedoya LM y Bermejo P. 2011.** Marine Compounds and their Antimicrobial Activities. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. FORMATEX Microbiology. 3 (1): 1293 – 1306.
- Alves-de-Souza C, MT González & JL Iriarte. 2008.** Functional groups in marine phytoplankton assemblages dominated by diatoms in fjords of southern Chile. J. Plankton Res., 30: 1233-1243.
- Amaro H., A Guedes & F Malcata. 2011.** Antimicrobial activities of microalgae: An invited review. Science against microbial pathogen: Communicating current research and technological advances. FORMATEX Microbiology. 3 (1): 1272 – 1280.
- Andersen RA. 2005.** Algal culturing Techniques. Elsevier Academic Press. Phycological Society of America. 90-92.
- Andrade V, LE Espinosa de los Monteros, V Jiménez, C Cervantes & J Silva. 2004.** Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* productora de la  $\beta$ -lactamasa SHV-5, en una unidad de cuidados intensivos. Salud Pública Mex. 46:524-528.
- Andrews JM. 2001.** Determination of Minimum Inhibitory Concentration. J Antimicrob Chemother, 48(1): 5 - 16.
- Arabski M, S Wasik, K Dworecki & W Kaca. 2009.** Laser interferometric and cultivation methods for measurement of colistin/ ampicilin and saponin interactions with smooth and rough of *Proteus mirabilis* lipopolysaccharides and cells. Journal of Microbiological Method. 77(2): 178–183.
- Blanchemain A & D Grizeau. 1999.** Increased production of eicosapentaenoic acid by *Skeletonema costatum* cells after decantation at low temperature. Biotechnol Tech 13:497–501.
- Bode HB, B Bethe , R Höfs & A Zeeck . 2002.** Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. Chembiochem. 2;3(7):619-27.
- Bustos-Martínez JA, A Hamdan-Partida & M Gutiérrez-Cárdenas.2006.** *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev Biomed 2006; 17:287-305.

- Cleve PT. 1889.** Pelagisk Diatomeer från Kattogat. In: Det Videnskabelige Udbytte af Kanonbaaden "Hauchs" Togter i de Danske Have Indefor Skagen, I. Aarene 1883-86. Petersen, C.G.J. Eds. Kjøbenhavn: Andr. Fred. Høst & Sons Forlag. 53-56.
- Cleve PT & JD Möller. 1882.** Diatoms, Part VI. Upsala: Esatas Edquists Boktryckeri. 277-324.
- Coronado W, L Valerio-González & H D'Armas. 2015.** Tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana preliminar de los extractos de la macroalga *Laurencia dendroidea*, J. Agardh, 1841 (*Rhodomelaceae: Rhodophyta*). SABER. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente. 27 (1): 61-66.
- Costa AA, ML Koenig & JM Sílvio. (1999).** Use of secondary sewage water as a culture medium for *Chaetoceros gracilis* and *Thalassiosira Sp (Chrysophyceae)* in laboratory conditions. Brazilian Archives of Biology and Technology, 42(2): 739-540.
- Demain AL. 2000.** Microbial Biotechnology. Trends in Biotechnology 18(1): 26-31.
- Desbois A, A Mearns-Spragg, V Smith. 2009.** A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Marine Biotechnology. 11(1):45-52.
- Díaz Puentes LN. 2009.** Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios. 1(2): 32-55.
- Fuad MAM, N Mohammad-Noor, AKC Jalal BY & Kamaruzzaman. 2015.** Growth Profile and Fatty Acid Accumulation of Four *Chaetoceros* Taxa Isolated from Coastal Water of Pahang, Malaysia. Sains Malaysiana 44(8): 1077–1084.
- Gales AC, M Castanheira, RN Jones, HS Sader. 2012.** Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). Diagn Micr Infec Dis.(73) 354-60.
- Gauthier M. 1969.** Antibacterial Activity of a marine diatom: *Asterionella notata*. Rev. Int. Oceanogr. Med. 15(16) 103-171.
- Gillan FT, NS Fischei & RB Johns. 1983.** The Effects of Copper and Zinc on the Fatty Acids and Carotenoids in the Marine Diatom *Asterionella japonica*. Botanica Marina (XXVI). 255-257.
- Gómez Luna L. 2007.** Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. Revista Cubana de Química. (XIX):3–20.

- Griffin S. 2000.** Aspects of antimicrobial activity of terpenoids and the relationship to their molecular structure. Tesis para obtener grado de doctorado. Universidad de Western Sidney, 301 p.
- Guillard RRL. 1973.** Methods for microflagellates and nannoplankton. In: Stein JR (ed) Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, Cambridge. 69-85.
- Harborne JB. & CA Williams. 2000.** Advances in flavonoid research since. *Phytochemistry*; 55:481-504.
- Hernández-Becerril DU. 2014.** Biodiversidad de algas planctónicas marinas (*Cyanobacteria*, *Prasinophyceae*, *Euglenophyta*, *Chrysophyceae*, *Dictyochophyceae*, *Eustigmatophyceae*, *Parmophyceae*, *Raphidophyceae*, *Bacillariophyta*, *Cryptophyta*, *Haptophyta*, *Dinoflagellata*) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* (85): 44 – 53.
- Hernández-Pérez A & JI Labbé. 2014.** Microalgae, culture and benefits. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* Vol. 49, N°2: 157-173
- Iriarte JL, RA Quiñones, RR González, CP Valenzuela. 2007.** Relación entre actividad enzimática y biomasa de ensamblajes fitoplanctónicos en el sistema pelágico. *Inv Mar Valparaiso* 35(1): 71-84.
- Ishii K-I, M Iwataki, K Matsuoka & I Imai. 2011.** Proposal of identification criteria for resting spores of *Chaetoceros* species (*Bacillariophyceae*) from a temperate coastal sea. *Phycologia* 50: 351–362.
- Jyotirmayee P, D Sachidananda & KD Basanta. 2014.** Antibacterial activity of freshwater microalgae: A review. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 8(32): 809 – 818.
- Kain JM & GE Fogg. 1958.** Studies on the Growth of marine phytoplankton I *Asterionella japonica* Gran. *J. mar. biol. Ass. UK.* 37:397-413.
- Karlson B, C Cusack & E Bresnan. 2010.** Microscopic and molecular methods for quantitative Phytoplankton analysis. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. *IOC Manuals and Guides* 55: 29-30.
- Karthikeyan P, K Manimaran, P Sampathkumar & L Rameshkumar. 2013.** Growth and nutrient removal properties of the diatoms, *Chaetoceros curvisetus* and *C. simplex* under different nitrogen sources. *Applied Water Science* (3): 49–55.

- Krayesky DM, ME Meave-del Castillo, E Zamudio, JN Norris & S Fredericq. 2009.** Diatoms (*Bacillariophyta*) of the Gulf of Mexico. In: Felder, D. L. & D. K. Camp (eds.). Gulf of Mexico origin, waters, and biota. Biodiversity. Texas A & M University Press. College Station, Texas, USA. 1:155-186.
- Lavens P & P Sorgeloos. 1996.** Manual on the production and use of live food for aquaculture FAO Fisheries Technical Paper. No. 361. Rome, FAO. 295p.
- Lavigne A, I Sunesen & E Sar. 2015.** Morphological, taxonomic and nomenclatural analysis of species of *Odontella*, *Trieres* and *Zygoceros* (*Triceratiaceae*, *Bacillariophyta*) from Anegada Bay (Province of Buenos Aires, Argentina) *Diatom Research* 30 (4): 307–331.
- Lebeau T & JM Robert. 2003.** Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: Current and putative products. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60:624–632.
- Lee SD & JH Lee. 2011.** Morphology and taxonomy of the planktonic diatom *Chaetoceros* species (*Bacillariophyceae*) with special intercalary setae in Korean coastal waters. *Algae* 26(2): 153 – 165.
- Lee YK. 1997.** Commercial production of microalgae in the Asia Pacific rim. *J Appl Phycol* 9:403–411.
- Licea S, ME Zamudio, JL Moreno-Ruiz & R Luna. 2011.** A suggested local regions in the Southern Gulf of Mexico using a diatom database (1979-2002) and oceanic hydrographic features. *Journal of Environmental Biology* 32:443- 453.
- Lima-Filho JVM, A Carvalho, SM Freitas & VMM Melo. 2002.** Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the Northeastern Brazilian coast. *Brazilian Journal of Microbiology* 33(4): 311 – 313.
- López-Elías JA, D Voltolina, M Nieves-Soto & L Figueroa-Ortiz. 2004.** Producción y Composición de Microalgas en Laboratorios Comerciales del Noroeste de México. In: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre. Hermosillo, Sonora, México. 636 – 649.
- Louis B & MD Rice. 2006.** Antimicrobial Resistance in Gram-Positive Bacteria. *The American Journal of Medicine* 119 (6A): S11–S19.

- Matos Moura A, E Bezerra Neto, ML Koenig & E Eskinazi Leca. 2007.** Chemical composition of three microalgae species for possible use in mariculture. *Braz Arch Biol Technol* 50(3): 461-467.
- Meave del Castillo ME, ME Zamudio-Resendiz y M Castillo-Rivera. 2012.** Riqueza Fitoplanctónica de la Bahía de Acapulco y Zona Costera Aledaña, Guerrero, México. *Acta Botánica Mexicana* 100: 405 – 487.
- Medina-Reyna CE & B Codero-Esquivel. 1998.** Crecimiento y composición bioquímica de la diatomea *Chaetoceros muelleri* Lemmerman, mantenida en cultivo estático en un medio comercial. *Ciencia y Mar* 2(6):19-25.
- Mejía C, J Zurita & M Guzmán Blanco. 2010.** Epidemiology and surveillance of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. *Braz J Infect Dis.* 14 (Suppl 2):S79-S86.
- Miranda-Estrada LI, M Ruíz-Rosas, J Molina-López, I Parra-Rojas, E González-Villalobos & N Castro-Alarcón. 2016.** Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades de México. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 8 p.
- Miranda Novales MG. 2011.** Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* in Mexico. *Bol Med Hosp Infant Mex* 68(4):262-270.
- Mitić-Æulafić D, B Vuković-Gašić, J Knežević- Vukčević, S Stanković, D Simić. 2005.** Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (*Salvia officinalis* L.). *Arch Biol Sci. Belgrade;* 57(3):173-178.
- Moreno-Díaz G, AA Rojas-Herrera, J González-González, J Violante-González, JL Rosas Acevedo, S García Ibáñez. 2015.** Variación temporal de la abundancia y composición de especies de fitoplancton colectado con red, en la Bahía de Acapulco, México. *Revista Bio Ciencias* 3(2): 88-102.
- Morones-Esquivel I, TG Salgado-Muñoz, TI Gonzaga-López, AP Matamoros-Mejía, JO Terán-González, S Arteaga-Vázquez, LJ Castro-D'Franchis, AE Reyes-Jiménez, DS López-González, D Meza-Oviedo. 2016.** Enterobacterias con betalactamasas de espectro extendido en hemocultivos y urocultivos. *Med Int Méx.* 32(4):381-387.

- Navarro-Navarro M, RE Robles-Zepeda, A Garibay-Escobar, E Ruiz-Bustos. 2011.** *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* comunitarias y hospitalarias productoras de  $\beta$ -lactamasas en hospitales de Hermosillo, Sonora Salud Publica Mex. 53: 341-344.
- Ncube NS, AJ Afolayan & AI Okoh. 2008.** Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. African Journal of Biotechnology 7 (12):1797-1806.
- Ojeda A. 2011.** Diatomeas de las aguas costeras de las Islas Canarias. Instituto Canario de Ciencias Marinas Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información Gobierno de Canarias. 14: 56.
- Pacheco-Vega JM, MA Cadena-Roa, MP Sánchez-Saavedra, D Tovar-Ramírez y CR Dávalos. 2010.** Effect of culture medium and nutrient concentration on fatty acid content of *Chaetoceros muelleri*. Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal 1(1):6-15.
- Pal R & AK Choudhury. 2014.** An Introduction of phytoplanktons: Diversity and Ecology. Springer India: 138 – 140.
- Paterson DL & RD Bonomo. 2005.** Extended spectrum  $\beta$ -lactamasas: a clinical updated. [ $\beta$ -lactamasas de amplio-espectro: Una actualización clínica]. Clinical Microbiology Reviews, 18, 657-86.
- Pérez CD. 1995.** “Cultivo Experimental de las Diatomeas *Thalassiosira subtilis*, *Skeletonema costatum* y *Chaetoceros affinis* en condiciones de Laboratorio para fines de Acuicultura”. Tesis para obtener grado de Maestría. Universidad de Colima, México, 61p.
- Pesando D. 1985.** Etude des proprietes antifongiques et antibacteriennes d'algues marinesa. Isolement, etude chimique et activite d'un polysaccharide et d'un glycolipide extraits de deux diatomees: *Chaetoceros lauderi* (Ralfs) et *Asterionella japonica* (Cleve). These de Doctorat. Universite Pierre et Marie Curie, Paris VI; 136 pp.
- Pratiwi AR, D Syah, L Hardjito, LM Goretti-Panggabean, M Thenawidjaja-Suhartono. 2009.** Fatty Acid Synthesis by Indonesian Marine Diatom *Chaetoceros gracilis*. Hayati Journal of Biosciences. 16 (4): 151-156.
- Ríos JL, MC Recio & A Villar. 1988.** Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. Journal of ethnopharmacology, 23: 127-149.



- Robles-Medina A, L Esteban-Cerdán, A Giménez-Giménez, B Camacho-Paez, MJ Ibañez-González, E Molina-Grima. 1999.** Lipase-catalysed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils. *J Biotechnol* 70:379–391.
- Rodriguez-Meizoso I, L Jaime, S Santoyo, FJ Señoráns, A Cifuentes & E Ibañez. 2010** Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. *J Pharm Biomed Anal* 51 (2): 456-463.
- Rojas-Herrera AA, J Violante-González, VMG Sevilla-Torres, JS Gil-Guerrero, P Flores-Rodríguez, JA Rendón-Dircio. 2012.** Species composition and abundance of phytoplankton communities in Acapulco Bay, Mexico. *International Research Journal of Microbiology* Vol. 3(9): 307-316.
- Round FE, RM Crawford & DG Mann. 2007.** Diatoms: Biology and Morphology of the Genera. Ilustrada, reimpressa. Cambridge University Press. 350-351.
- Roze LV, A Chanda & JE Linz. 2011.** Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. 48: 35–48.
- Sánchez-Saavedra M, A Licea-Navarro, J Bernáldez-Sarabia. 2010.** Evaluation of the antibacterial activity of different species of phytoplankton *Revista de Biología Marina y Oceanografía*.45 (3): 531-536.
- Saleem M, M Nazir, MS Ali, H Hussain, YS Lee, N Raiz, A Jabbar. 2010.** Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat. Prod. Reports* 27:238–254.
- Sepúlveda Jiménez G, H Porta Ducoing, M Rocha Sosa. 2003.** La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21 (3): 355-363.
- Servel MO, Claire C, Derren A, Coiffard L & Roeck-Hoitzhauer Y. 1994.** Fatty acid composition of some marine microalgae. *Phytochemistry*. 36(3): 691-693.
- Silva J, R Gatica, C Aguilar, Z Becerra, U Garza, M Velázquez et al. 2001.** Outbreak of infection with extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican hospital. *J Clin Microbiol* 39: 3193–3196.
- Sunesen I & EA Sar. 2007.** Diatomeas marinas de aguas costeras de la provincia de Buenos Aires (Argentina). III Géneros potencialmente nocivos *Asterionellopsis*, *Cerataulina*, *Ceratoneis* y *Leptocylindrus*. *Revista Chilena de Historia Natural* 80: 493-507.

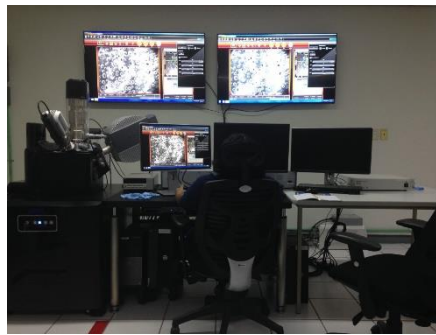
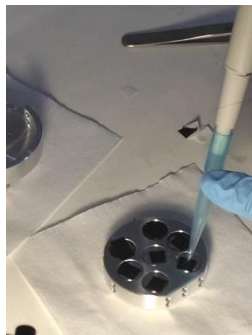
- Sunesen I, DU Hernández-Becerril & EA Sar. 2008.** Marine diatoms from Buenos Aires coastal waters (Argentina). V. species of the genus *Chaetoceros*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43(2): 303 – 326.
- Sushanth VR & M Rajashekhar. 2015.** Antioxidant and antimicrobial activities in the four species of marine microalgae isolated from Arabian Sea of Karnataka coast. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 44(1): 69-75.
- Tilman D & S Sotau. 1976.** Phosphate and silicate growth and uptake kinetics of the diatoms *Asterionella formosa* and *Cyclotella meneghiniana* in batch and semicontinuous culture. *J. Phycol.* 12:375-383.
- Van Heurck H. 1882.** *Synopsis des Diatomées de Belgique* Atlas pls. LXXVIII-CIII. Anvers: Ducaju et Cie.
- Viso AC, D Pesando & C Baby. 1987.** Antibacterial and Antifungal Properties of Some Marine Diatoms in Culture. Institut National de la Sante et. de la Recherche Medicale LN.S.E.R.M. Unite 303 "Mer et Sante", La Darse, B.P. n° 3, 06230 Villefranche-sur-Mer, France. *Botánica marina* 30: 41-45.
- Volkman JK, G Eglinton & EDS Corner. 1980.** Sterols and fatty acids of the marine dinoflagellate *Biddulphia sinensis*. *Phytochemistry* 19:1809-13.
- Wagner H & S Blatt. 2001.** *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. 2<sup>nd</sup> ed. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York. 384 p.
- Walter CS & R Mahesh. 2000.** Antibacterial and antifungal activities of some marine diatoms in culture. *Indian Journal of Marine Sciences* 29: 238-242.
- Wang Q, C Liu, S Zhang, L Sun, C Wang. 2010.** Extraction and Antimicrobial Effect of Active Components from *Chaetoceros curvisetus*. *Food Science Bioengenergy*. 31 (5): 181-183.
- Xia S, K Wang, L Wan, A Li, Q Hu & C Zhang. 2013.** Production, Characterization and Antioxidant Activity of Fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*. *Mar Drugs*. 11(7) 2667-2681.
- Yongmanitchai W & OP Ward. 1989.** Omega-3 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochem.* 24:117–125.

## ANEXOS

### Anexo 1. Aislamiento, identificación y cultivo de diatomeas marinas

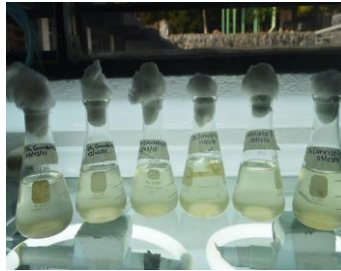
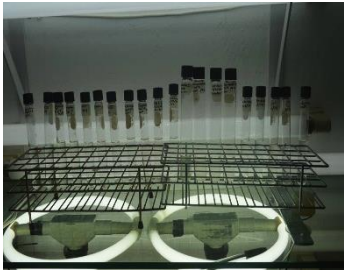
El aislamiento de las células se realizó mediante el método de pipeta descrito por Andersen (2005), para lo cual se deposita una gota de muestra planctónica sobre un portaobjetos y colocando una pipeta Pasteur con punta reducida por encima de las células de interés, estas son succionadas por capilaridad. La muestra se transfiere a una gota de agua marina estéril sobre otro portaobjetos y se repite este procedimiento entre 5 y 6 veces hasta observar células de una sola especie. Esta muestra es inoculada en 9 mL de solución (cepa madre) que contiene medio de cultivo F/2 (Sigma-Aldrich® St. Louis, USA) en agua marina estéril a una concentración de 4 mL L<sup>-1</sup> (Guillard 1973).

Las especies *Chaetoceros curvisetus*, *Asterionella japonica* y *Biddulphia mobiliensis* fueron identificadas con un microscopio óptico binocular (Leica, 1349521X, Buffalo, N.Y., USA) utilizando los objetivos 10x y 40x con base en las características morfológicas reportadas por Round *et al.* (2007). Estas características fueron confirmadas con las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (Microscopio Electrónico de Barrido Jeol T300) para lo cual las muestras se prepararon realizando de 4 a 5 lavados con agua destilada y se centrifugaron a 1500 rpm con el objetivo de eliminar el exceso de sal y obtener muestras parcialmente limpias mejorando así la calidad de las micrografías. Las muestras se colocaron sobre el soporte y se dejaron secar, ya que deben estar exentas de humedad, disolventes y líquidos en general y para facilitar el proceso fueron recubiertas por grafito.



Para obtener cultivos monoespecíficos, se prepararon inóculos en tubos de ensaye (16 x 150), agregando 9 mL de solución de medio de cultivo F/2 (4 mL L<sup>-1</sup>) y 1 mL de la cepa madre (inóculo). Se incubaron durante seis a siete días y se transfirieron a matraces de 250 mL de volumen, colocando 100 mL de solución de medio de cultivo F/2 y 10 mL de inóculo.

Finalmente se obtuvieron cultivos de 1 L de solución de medio de cultivo F/2 añadiendo 200 mL de inóculo en matraces de 2 L de volumen, manteniendo las siguientes condiciones de cultivo para los tres escalamientos: temperatura constante de 25 ± 0.5 °C, pH de 7.9, salinidad de 30-32 ups y un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (ciclo circadiano). Los cultivos monoespecíficos se hicieron por triplicado (Pérez 1995, modificado).



## **Anexo 2.** Evaluación de la actividad antibacteriana (Ríos *et al.* 1988)

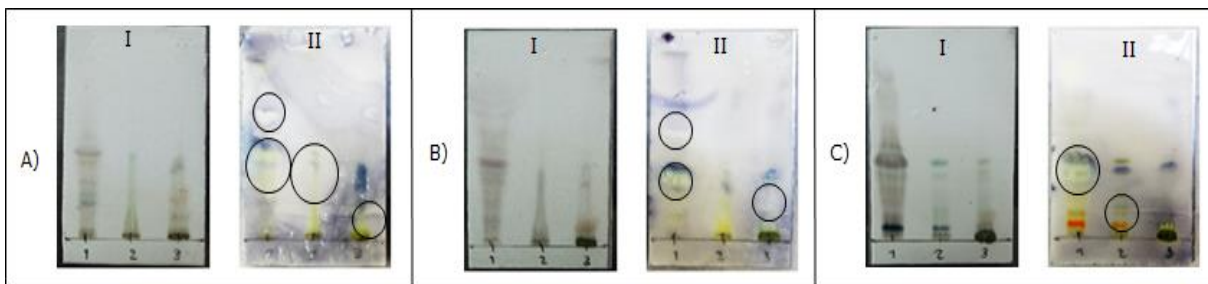
### *Método bioautográfico*

La bioautografía pertenece a los métodos comúnmente utilizados de detección de actividad antimicrobiana, y se puede definir como el primer procedimiento que se aplica a una muestra analizada con el fin de establecer la presencia o ausencia de actividad. Es un método simple y barato que no requiere de equipo sofisticado ya que puede realizarse mediante CCF.

El procedimiento seguido en este estudio fue el siguiente: Se prepararon dos cromatoplasmas de sílica gel (No. 60 Merck) de 5 x 3 cm, sobre el punto de aplicación se colocaron los extractos con ayuda de un capilar con punta reducida.

Las cromatoplasmas fueron eluidas en un sistema hexano: acetona (7:3), una de las cromatoplasmas sirvió como control para la localización de los compuestos, siendo analizada bajo luz ultravioleta (302 y 365 nm) y revelada con revelador ácido (10% ácido sulfúrico, 90% agua). La segunda cromatoplasma se sumergió en una suspensión de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ajustado al estándar 0,5 de Mc Farland ( $1-2 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) durante 30 s y se incubó a 37 °C durante 24 h en cámara húmeda. Transcurrido el tiempo de incubación el cromatograma se roció con una capa ligera y homogénea de una solución acuosa de cloruro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil-2H- bromido-tetrazolium (MTT, Merk®, 3 mg/10 mL de agua destilada) como colorante vital y se incubó a 37 °C durante 30 min. La actividad antibacteriana se interpretó como manchas blancas o zonas de inhibición del crecimiento bacteriano en un fondo violeta.

La visualización de estas zonas se lleva a cabo habitualmente utilizando reactivos de detección de actividad deshidrogenasa siendo las más comunes las sales de tetrazolio. La deshidrogenasa de microorganismos vivos convierte la sal de tetrazolio en formazan intensamente coloreado. Como resultado, aparecen puntos blancos cremosos contra un fondo púrpura sobre la superficie de la placa de TLC, señalando la presencia de agentes antibacterianos.



Bioautografía de extractos totales 1) Hexano, 2) Diclorometano y 3) Acetona de A) *Chaetoceros curvisetus*, B) *Asterionella japonica* y C) *Biddulphia mobiliensis*. I) Cromatoplatea control, II) Actividad biológica (Los círculos indican la inhibición de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213)

### Método de microdilución

La cuantificación de la actividad in vitro de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar) utilizando una escala discontinua (habitualmente concentraciones crecientes en base 2) en vez de una escala continua (como sucede en el método de difusión).

El procedimiento empleado en este estudio fue el siguiente:

Se evaluaron los extractos de hexano, diclorometano y acetona de las especies *Chaetoceros curvisetus*, *Asterionella japonica* y *Biddulphia mobiliensis*, para lo cual se empleó una microplaca de 96 pozos de fondo plano en dónde se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de caldo Luria Bertani (LB) y diluciones seriadas a diferentes concentraciones (0.5, 1, 2, 4, 8, 16 y 32  $\text{mg mL}^{-1}$ ) de los extractos previamente diluidos con dimetilsulfóxido (DMSO, 200  $\mu\text{L}$ ) y agua (800  $\mu\text{L}$ ). Se inocularon 2  $\mu\text{L}$  de cepas bacterianas y se incubaron a 37 °C por 24 h.

Se utilizaron cepas bacterianas ATCC Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus sciuri* ATCC 29061, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus caseofluvialis* ATCC 700327 y bacterias ATCC Gram negativas: *Enterobacter cloacae* ATCC 700323, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomona*

*aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y *Salmonella dublin* NTCC 9676 estandarizadas al 0,5 de la escala Mc Farland ( $1-2 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>).

Se usó ceftazidima ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) como control positivo y dos controles negativos: el primero compuesto de caldo LB y bacterias Gram negativas y Gram positivas tipo ATCC y el segundo de caldo LB y DMSO.



Las placas fueron leídas utilizando el equipo Multiskan GO ThermoScientific (Vantaa, Finland) ajustado a 600 nm y analizado con el software SkanIt Software 4.1. con lo cual se determinó la CMI a partir de la comparación entre las absorbancias considerándose activos todos los extractos con concentraciones menores a  $8 \text{ mg mL}^{-1}$ .

### Anexo 3. Perfil fitoquímico

Se prepararon cromatoplasmas de sílica gel (No. 60 Merck) de 5 x 3 cm, sobre el punto de aplicación se colocaron los extractos con ayuda de un capilar con punta reducida.

Las cromatoplasmas fueron eluidas en un sistema hexano: acetona (7:3) y reveladas con reveladores específicos utilizando un hisopo para recubrir las cromatoplasmas con cada reactivo, según lo reportado por Wagner *et al.* 2010:

- *Alcaloides (Reactivo Dragendorff)*

Preparación del Reactivo:

Solución a). Se disuelven 0,85 g de nitrato de bismuto básico en 10 mL de ácido acético y 40 mL de gua.

Solución b). Se disuelven 8 g de yoduro de potasio en 30 mL de agua.

Las soluciones son mezcladas en una proporción 1:1

Detección:

A UV-365 nm se observan manchas fluorescentes de color azul, verde azulada o violeta.

Después de agregar el reactivo, los alcaloides aparecen inmediatamente como zonas de color marrón o marrón anaranjado.



*C. curvisetus*



*A. japonica*



*B. mobiliensis*



- Flavonoides (Vainillina-ácido clorhídrico)

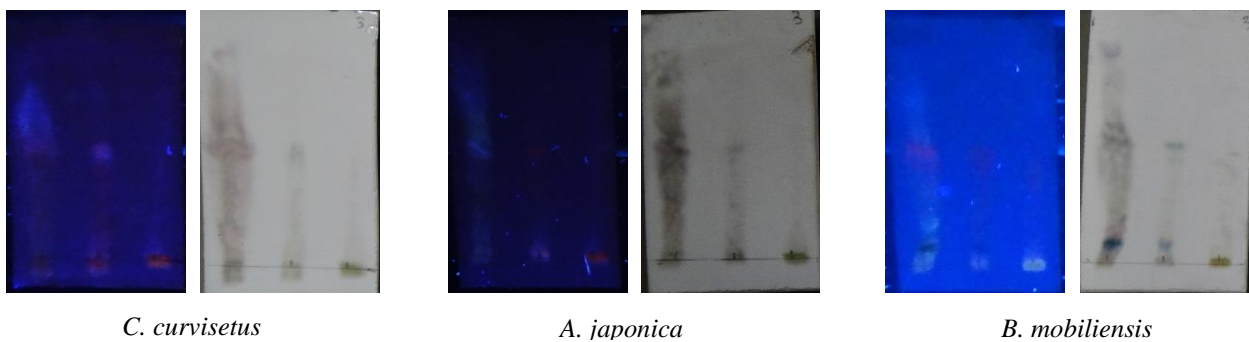
Preparación del reactivo:

5 mL de solución de vainilina etanólica al 1%

3 mL de solución de vainilina etanólica concentrada

Detección:

A UV-365 nm los flavonoides se muestran en amarillo oscuro, verde o azul. Los extractos de flavonoides a menudo contienen ácidos fenolcarboxílicos y cumarinas que forman zonas fluorescentes azules.



- Triterpenos (Reactivo de Liebermann-Burchard)

Preparación del reactivo:

5 mL de anhídrido acético

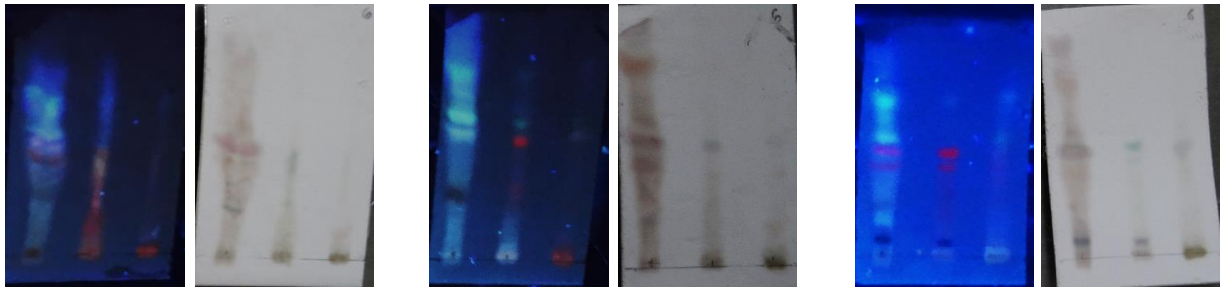
5 mL de ácido sulfúrico concentrado

Añadir cuidadosamente a 50 mL de etanol absoluto, mientras se enfría en hielo.

Detección:

A UV-365 nm se observan manchas de color azul fluorescente

Después de agregar el reactivo y de haber observado en una lámpara de UV, las cromatoplasmas deben calentarse a 100 °C durante 5 a 10 min. Una vez transcurrido el tiempo se deben observar manchas color azul-violeta o rojo que indican la presencia de triterpenos.



*C. curvisetus*

*A. japonica*

*B. mobiliensis*

- Aceites esenciales (Vainillina- ácido sulfúrico)

Preparación del reactivo:

Solución a). Vanilina etanólica al 1%.

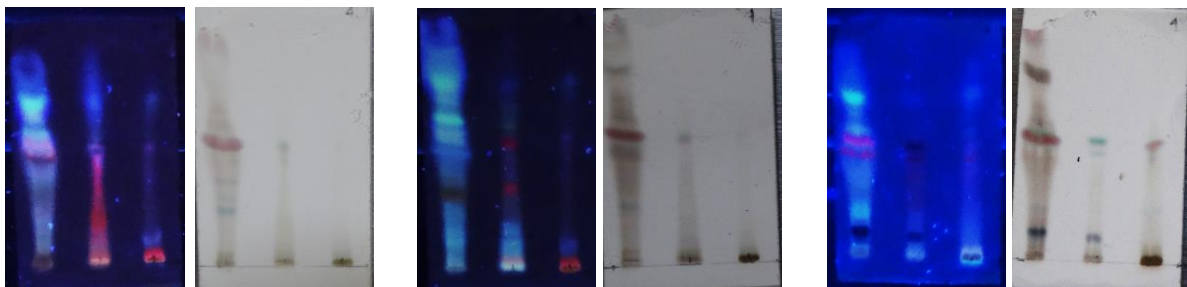
Solución b). Ácido sulfúrico etanólico al 10%

Las cromatoplasmas deben rociarse con ambas soluciones.

Detección:

A UV-365 nm se observan manchas fluorescentes de color azul, rojo y azul marino

Después de agregar el reactivo y de haber observado en una lámpara de UV, las cromatoplasmas deben calentarse a 100 °C durante 5 a 10 min. Una vez transcurrido el tiempo se deben observar manchas color rojo y verde.



*C. curvisetus*

*A. japonica*

*B. mobiliensis*

- Lignanós (Vainillina-ácido fosfórico)

Preparación del reactivo:

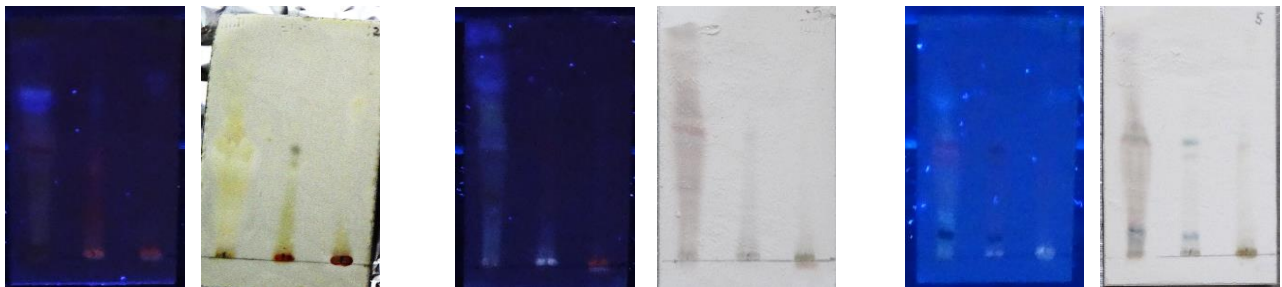
Solución a). Disolver 1 g de vainillina en 100 mL de ácido fosfórico al 50%.

Solución b). Disolver dos partes de ácido fosfórico al 24% y ocho partes de ácido vanílico etanólico al 2%.

Las cromatoplacas deben rociarse con ambas soluciones.

Detección:

A UV-365 nm se observan manchas azul fluorescente



*C. curvisetus*

*A. japonica*

*B. mobiliensis*

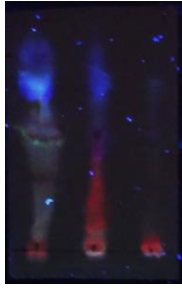
- Quinonas y cumarinas (Hidróxido de potasio)

Preparación del reactivo:

Hidróxido de potasio al 5%

Detección:

A UV-365 nm se observan manchas fluorescentes azul, verde-azul, amarillo, marrón (cumarinas) y rojo (quinonas)



*C. curvisetus*



*A. japonica*



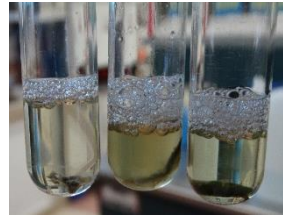
*B. mobiliensis*

- Saponinas (Prueba de espuma)

La prueba cualitativa de espuma consiste en colocar 3 mL de agua tibia y agregar la muestra a evaluar, posteriormente se agita rigurosamente durante 15 s y se debe formar una espuma estable como la obtenida al agitar una solución acuosa de un jabón.



Negativa



Positiva