



## FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

# OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA EVALUAR LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE CIANOBACTERIAS

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Septiembre 2018

**Autor:** María Paz Marí Parra

**Modalidad:** Experimental

**Tutores:** Antonia Dolores Asencio Martínez; Gisela Díaz Espejo; M<sup>a</sup> Teresa Pretel Pretel

### ***Agradecimientos:***

Quisiera agradecer a todos los que han hecho posible este trabajo pero ante la imposibilidad de nombrar a todos voy a hacer mención a los más especiales:

A mis tutoras que, aparte de la gran paciencia que han tenido conmigo, me han ayudado tanto académicamente. Siempre brindándome toda la ayuda posible, facilitándome en todo momento todo lo que he necesitado. Ha sido muy duro ir y volver casi todos los días desde el laboratorio en Elche, que además tampoco ha sido fácil para vosotras. Creo que me habéis dado más de lo que yo imaginaba y espero que este proyecto se siga desarrollando en un futuro junto con vosotras. Gracias a vosotras me habéis despertado una pasión por las cianobacterias, e incluso he aprendido más de los hongos de lo que yo pensaba. Ha sido un arduo trabajo y espero haber dado lo mejor de mí, espero mejorar siempre a más para ser una auténtica profesional.

A la Universidad, que sin ella nunca habría podido formarme ni adquirir los conocimientos que he alcanzado. Estos años han sido gratos, sin duda, y ha despertado mi pasión por seguir estudiando con gente tan maravillosa.

A mis padres por ayudarme económicamente en todo lo posible para que fuera al laboratorio. Sé que ha sido difícil tanto viaje, pero sin vuestro apoyo nunca hubiera podido mejorar tanto como persona y académica.

A mis amigos por estar también conmigo, pasando todos los momentos tanto para lo bueno como para lo malo, aunque siempre pesan más los mejores momentos inolvidables.

*A todos, por todo lo que me habéis ofrecido en todo momento de la vida, gracias.*

## ÍNDICE

### **RESUMEN Y PALABRAS CLAVE**

#### **I. INTRODUCCIÓN**

1.1.	Generalidades de cianobacterias.....	1
1.2.	Aplicaciones farmacéuticas de cianobacterias .....	5
1.3.	Capacidad antifúngica de cianobacterias.....	5
1.4.	Generalidades de hongos.....	6
1.5.	Problemas causados por hongos patógenos y oportunistas en plantas.....	7

#### **II. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....8**

#### **III. METODOLOGÍA**

3.1.	Recolección, aislamiento y cultivo de las cianobacterias utilizadas.....	9
3.1.1.	Crecimiento de las colonias.....	11
3.1.2.	Cultivo en medio líquido.....	12
3.2.	Obtención de extractos de cianobacterias.....	14
3.3.	Análisis espectrofotométrico de los extractos.....	16
3.4.	Recolección, aislamiento y cultivo de los hongos utilizados.....	17
3.5.	Obtención del inóculo fúngico.....	17
3.6.	Determinación de la capacidad antifúngica de los extractos de cianobacterias.....	18
3.6.1.	Elección del antifúngico control para el ensayo antifúngico por difusión de disco.....	18
3.6.2.	Filtrado de los extractos algales.....	20
3.6.3.	Test de sensibilidad por la técnica de difusión en disco....	20

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1.	Cianobacterias aisladas y de colección utilizadas.....	22
4.2.	Optimización de la obtención de los extractos y su caracterización....	25
4.3.	Hongos aislados y de colección utilizados.....	26

4.4. Optimización de la obtención del inóculo fúngico.....	28
4.5. Selección del antibiótico control.....	29
4.6. Capacidad antifúngica de los extractos de cianobacterias.....	30
<b>V. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA.....</b>	<b>34</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>35</b>



**Resumen:**

Las cianobacterias pueden sintetizar una inmensa cantidad de metabolitos secundarios con distinta actividad farmacológica. Debido a la necesidad por encontrar nuevos compuestos con actividad antifúngica, se ha intentado poner a punto y desarrollar un procedimiento que incluya desde la extracción hasta la caracterización de los resultados para evaluar la capacidad antifúngica de diferentes especies de cianobacterias. Los resultados indican que, tanto el método de extracción como el método de difusión de disco en agar, ambos optimizados, son adecuados para evaluar la capacidad antifúngica sobre hongos filamentosos patógenos y oportunistas de tipo moho. Sin embargo, la actividad antifúngica no ha podido demostrarse con evidencia en los ocho extractos cianobacterianos frente a los seis hongos seleccionados bajo las condiciones ambientales descritas.

**Abstract:**

Cyanobacteria can synthesize an immense number of secondary metabolites with different pharmacological activity. Due to the need to find new compounds with antifungal activity, it has been tried to develop a procedure that includes from the extraction to the characterization of the results to evaluate the antifungal capacity of different species of cyanobacteria. The results indicate that both the extraction method and the disk diffusion method in agar, both optimized, are appropriate to evaluate the antifungal capacity on mould-type pathogenic and opportunistic filamentous fungi. However, the antifungal activity has not been demonstrated with evidence in the eight cyanobacterial extracts against the six fungi selected under the environmental conditions described.

**Palabras clave/Key words:** Cianobacteria/cyanobacteria, hongos/fungi, metabolitos secundarios/secondary metabolites, capacidad antifúngica/antifungal capacity, extractos cianobacteria/cyanobacteria extracts

# I. Introducción

## 1.1. Generalidades de Cianobacterias

Las cianobacterias, también llamadas algas verde-azuladas, cianofíceas o cianoprocariontes, son organismos procariotas autótrofos con la capacidad de realizar la fotosíntesis oxigénica. La gran mayoría de las cianobacterias producen un pigmento denominado ficocianina<sup>1</sup> el cual es el responsable de dar el color característico por el cual fueron denominadas durante mucho tiempo, aunque en algunos casos se puede apreciar un color rojizo ya que también pueden sintetizar un pigmento llamado ficoeritrina<sup>1</sup>.

Su distribución por el planeta es casi completa, siendo uno de los organismos mejor adaptados a los diversos ecosistemas debido a su diversidad. Están presentes tanto en zonas marítimas como terrestres e incluso pueden resistir un amplio rango de temperaturas, como en hábitats polares, zonas áridas, zonas con actividad geotérmica o incluso zonas de escasa luminosidad como cuevas. También se ha registrado presencia de cianobacterias en zonas de alta salinidad<sup>2</sup> e incluso como simbioses de otros organismos como plantas u hongos.

Se datan registros muy antiguos sobre su existencia en el planeta. La presencia de estructuras cianobacterianas calcificadas llamadas estromatolitos (Figura 1) y diversos restos fósiles datan de más de 2.500 millones de años<sup>3</sup>. En su estudio se ha podido comprobar que la estructura de las cianobacterias se ha conservado muy bien ya que tienen gran parecido en la actualidad. Se considera también que son los responsables del enriquecimiento atmosférico de oxígeno gracias a la fotosíntesis oxigénica y que guardan un papel fundamental en la historia evolutiva de la biosfera actual debido a este fenómeno<sup>4</sup>.



**FIGURA 1.** Estructura de un estromatolito de la bahía de Shark, Australia. Son estructuras fosilizadas de colonias antiguas de cianobacterias formadas en capas estratificadas carbonatadas<sup>5</sup>

Otro de sus roles importantes en el ecosistema es el de su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico por un proceso enzimático denominado fijación biológica del nitrógeno. Para ello cuentan con un sistema enzimático de nitrogenasas. Son notoriamente importantes en mares, océanos o lagos ya que tienen la capacidad de formar *blooms*<sup>6</sup> o colonias de cianobacterias, que están incluidas como plancton que proveen alimento en la biosfera marina. Estos *blooms* incorporan este nitrógeno en las zonas acuáticas junto con otros micronutrientes, además de la importancia de su capacidad fotosintética. Pese a esta capacidad, también se sabe que algunas formaciones de *blooms* de cianobacterias pueden ser también perjudiciales para el ecosistema. Las cianobacterias tienen la capacidad de desarrollar por medio de vías alternativas metabolitos secundarios como las denominadas cianotoxinas, que pueden llegar a ser tóxicos y tienen gran impacto en la biosfera acuática e incluso para el ser humano<sup>7,8</sup>.

Algunas especies de cianobacterias que viven en zonas geotérmicas como géiseres, utilizan el ión sulfuro como dador de electrones en la fotosíntesis. Esto es debido a que este tipo de hábitat está enriquecido con sulfuro, que inhibe la fotosíntesis, pero en este caso es utilizado por estas cianobacterias sulfuro-tolerantes en vez de oxígeno<sup>9</sup>

En cuanto a la morfología celular, se las reconoce por ser procariontes cuya pared celular es Gram negativa y cuyos orgánulos no están envueltos por ninguna capa lipídica y poseer mecanismos para realizar la fotosíntesis.

- Estructura citológica (figura 2): están compuestas por una pared celular de peptidoglucano, que puede estar rodeada de mucílagos depositados por la célula a modo de protección<sup>10</sup>. Tras la capa se encuentra una membrana plasmática que separa y contiene el citoplasma. Dentro de este se sitúa el ADN bacteriano sin núcleo diferenciado, ribosomas de tipo 70S y unas membranas tilacoidales cuya relevancia se debe a que almacenan los pigmentos utilizados en la fotosíntesis oxigénica y son clorofila a, ficobiliproteínas (ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina) y carotenoides. Las ficobiliproteínas se encuentran dentro de ficobilisomas, y sirven como pigmentos antena que protegen de la luz ultravioleta a la clorofila. Otro pigmento que sintetizan, en el citoplasma son aminoácidos tipo micosporina (MAASs)<sup>11</sup> que también les sirve de protector ante radiaciones. Se pueden encontrar gránulos de cianoficina y volutina como reservorio de nitrógeno, estructuras enzimáticas como carboxisomas y vacuolas de gas que regulan su flotabilidad en agua<sup>12</sup>.

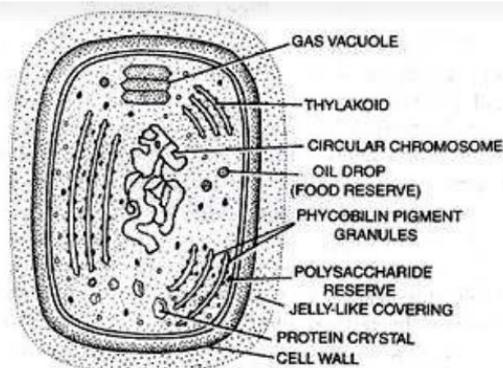
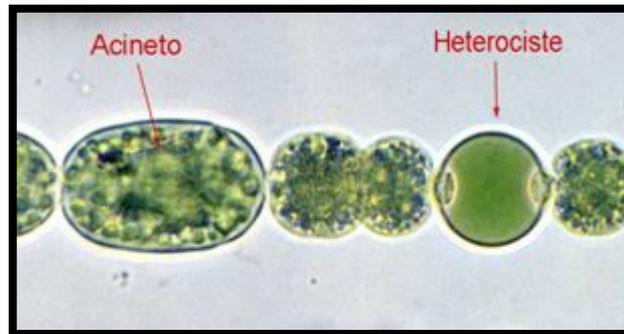


Fig. 2.18. Ultrastructure of a cyanophycean cell.

**Figura 2:** estructura general de una cianobacteria. Pared celular y orgánulos que la componen<sup>13</sup>

- Pueden presentarse algunas formas especiales que les sirven para resistir ante condiciones ambientales desfavorables como cambios de temperatura, pH o baja concentración de oxígeno. Entre ellas podemos

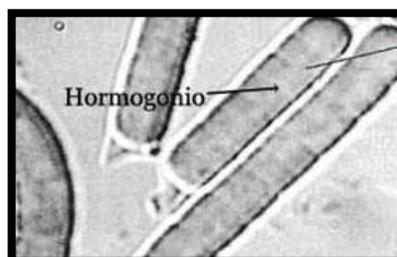
encontrar los acinetos (figura 3) que son estructuras de pared más gruesa donde se especializan y almacenan nutrientes necesarios mientras están latentes y los heterocitos (figura 3) que son estructuras que sirven para asimilar nitrógeno atmosférico<sup>14</sup>.



**Figura 3:** Estructura de un acineto y un heterocito de *Nostoc*<sup>12</sup>

Aunque hay más de 2000 especies de cianobacterias, se pueden clasificar morfológicamente como organismos unicelulares independientes o formadoras de colonias como por ejemplo las pertenecientes al género *Chroococcus*, o bien pueden presentarse en formas filamentosas como pueden ser las pertenecientes a los géneros *Nostoc* u *Oscillatoria*. Aunque carecen de orgánulos para transportarse, algunas especies filamentosas presentan ligera actividad de movimiento por deslizamiento.

En cuanto a la forma de reproducción se realiza por división celular binaria. Las especies filamentosas tienen la característica de formar hormogonios (figura 4), que son extensiones de sus tricomas en trozos pequeños.



**Figura 4:** hormogonio de una especie filamentosas de cianobacteria<sup>15</sup>

## 1.2. Aplicaciones farmacéuticas de cianobacterias

Las vías secundarias de síntesis en las cianobacterias son de gran interés en investigación en muchos ámbitos de trabajo, con el principal punto de mira en aquellos que no generan toxicidad en el medio ambiente ni en los seres vivos. La aplicación de estos metabolitos generados es inmensa, se han estudiado muchos con diversos usos como nuevos biocombustibles, alternativa natural a los actuales biocidas, biofertilizantes para agricultura, queladores, productos cosméticos o moléculas de interés farmacéutico o bioquímico<sup>16</sup>. Principalmente el interés industrial se basa en buscar nuevas alternativas respetuosas con el medio ambiente, de menor coste de producción y que pueda satisfacer la demanda farmacológica futura en cuanto a nuevos tratamientos.

Para la industria farmacéutica hay un amplio repertorio de usos. Se ha investigado muchos metabolitos de los cuales han podido evidenciar actividad antibacteriana, antivírica, antifúngica, antiparásita, antiinflamatoria e incluso antitumoral<sup>17</sup>. Entre estos pueden encontrarse moléculas como diversos tipos de péptidos y lipopéptidos, ácidos grasos, alcaloides o alcaloides indólicos, policétidos y algunos terpenos. Por ejemplo se comercializa en la industria *Spirulina platensis* como precursor del ácido araquidónico además de sus propiedades como complemento alimenticio, aunque también se ha conseguido aislar polisacáridos como el denominado calcium-spirulan o Ca-SP, que ha demostrado actividad antivírica<sup>18</sup> frente al virus VIH tipo I y *Herpes simplex* tipo I. Otros metabolitos estudiados como la dolastina 10 o la curacina a han demostrado tener actividad farmacológica antitumoral en microtúbulos de células eucariotas tumorales, esta última aislada de cianobacterias del género *Lyngbya*<sup>19</sup>.

Por otra parte, la investigación farmacéutica basa sus actividades por la necesidad de buscar nuevas estrategias ante la amenaza de resistencias microbianas a los tratamientos actuales.

## 1.3. Capacidad antifúngica de cianobacterias

La actividad antifúngica que presentan algunas cianobacterias se basa en la necesidad competitiva en un hábitat cohabitado por ambos cuando no existe o

no es compatible la simbiosis. La resistencia a antifúngicos es común en el ámbito médico especialmente en personas que han recibido largos periodos de profilaxis con antifúngicos o pacientes inmunodeprimidos, especialmente ante infecciones de la especie *Candida spp*<sup>20</sup>.

Se ha demostrado actividad antifúngica en algunas especies de cianobacterias de los géneros *Nostoc*, *Scytonema* o *Anabaena*, encontrándose metabolitos<sup>21,22</sup> con evidencia antifúngica conocida *in vitro*: lipopéptidos como anabaenolisinas, *fischerellina A*, *nostofungicidinas*, alcaloides como *hapalindoles*, *carazostatinas*, *tjipanozoles* o *nostodiona*, glicolipopéptidos como las *hassallidinas*, ciclopéptidos como las *nostociclamidas* o nucleósidos como *tolytoxinas*, *scytophycinas* y *toyocamicinas*. Pueden ser sintetizados tanto en vías ribosomales como en vías ribosoma-independiente mediante complejos enzimáticos<sup>21</sup>. Pese a lo estudiado, también se sabe que no todas las especies agrupadas producen los mismos compuestos bioactivos, pudiendo o no sintetizar antifúngicos<sup>21</sup>.

#### **1.4. Generalidades de hongos**

Los hongos<sup>23</sup> son organismos eucariotas, heterótrofos, talófitos, cuya pared celular está compuesta por quitina-glucano. Aunque hay algunos hongos que son ameboides o unicelulares como las levaduras, la inmensa mayoría son filamentosos, es decir tienen una parte vegetativa formada por unos filamentos denominados hifas, cuyo conjunto se conoce como micelio. Estas hifas son septadas en la mayoría de los grupos de hongos aunque otros grupos tienen hifas sin septos. Se trata por tanto de un grupo muy variado y de diferentes orígenes filogenéticos, que se pueden incluir en tres reinos. De forma muy general se puede decir que el término hongo comprende organismos ameboides que se incluyen en el Reino Protozoa, los llamados *Pseudohongos* con hifas aseptadas, esporas flageladas y pared celular con celulosa, que se incluyen en el reino Chromista, y los hongos verdaderos que se incluyen en el reino Fungi. Puesto que son heterótrofos, existen entre los hongos distintas estrategias nutricionales. Hay hongos parásitos, otros son saprófitos y otros simbiontes mutualistas. En muchos casos, especies de hongos que son

saprófitos pueden actuar como parásitos en función de las condiciones ambientales o del momento del ciclo vital.

### **1.5. Problemas causados por hongos patógenos y oportunistas en plantas en la agricultura**

La mayoría de las enfermedades de las plantas como el mildiú, oidios, necrosis, enfermedades vasculares, royas, carbonos o micosis post-recolección están producidas por hongos, lo que da lugar a graves pérdidas económicas cada año. Muchas de estas enfermedades están producidas por hongos estrictamente parásitos, como es el caso del mildiú de la patata producido por *Phytophthora infestans*. Otros son parásitos facultativos, como muchas especies de *Fusarium*, que pueden sobrevivir en el suelo alimentándose de materia orgánica y tener una fase parasítica en plantas, produciendo enfermedades vasculares como en tomate, melón y otros cultivos. Otros hongos son saprofitos habitualmente, pero colonizan con facilidad productos orgánicos almacenados comportándose como oportunistas y dando lugar a las llamadas enfermedades postcosecha que aparecen en la fruta una vez recolectada. Algunos de los más comunes son *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis cinérea*, *Rhizopus* y *Alternaria*. Aunque los efectos pueden variar según la especie, en general producen podredumbre, cambios organolépticos y degradación, con la consiguiente pérdida de calidad.

La prevención y tratamiento de estas micosis conlleva un enorme coste económico y la utilización de pesticidas que en muchos casos son peligrosos para la salud humana y para el medio ambiente. Existe un creciente interés por parte de productores, industria químico-farmacéutica y consumidores en la búsqueda de nuevos productos biotecnológicos naturales más sanos y respetuosos con el medio ambiente. Como se ha comentado anteriormente, las cianobacterias han demostrado ser buenas productoras de metabolitos fungicidas cuyo coste de producción podría ser reducido ya que no requieren condiciones especiales de cultivo.

## II. Antecedentes y objetivos

En la última década ha aumentado el interés por explorar bioproductos con capacidad antagonista frente a hongos patógenos como una alternativa a los productos químicos de síntesis. La investigación con cianobacterias es muy prometedora debido a la demostrada actividad antimicrobiana, pudiendo constituir una alternativa potencial como agentes de biocontrol en el ámbito de la industria agroquímica y farmacéutica. Sin embargo, los estudios en este campo son muy escasos. Aunque la mayoría de los trabajos de investigación se enfocan en ensayos con hongos patológicos para el ser humano, se ha estudiado también el uso de cianobacterias en agricultura como alternativa a fungicidas convencionales. Se trata de hallar la posible actividad, la efectividad ante otros antifúngicos convencionales o bien cribar y caracterizar las especies cianobacterianas, así como caracterizar los metabolitos que presentan dicha actividad.

Kumar et al, (2013)<sup>24</sup> sugieren que se debería explorar más la actividad antifúngica de las cianobacterias ya que la mayoría de antifúngicos en uso humano derivan de otros microorganismos y demuestra que especies como *Lyngbya aestuarii* y *Aphanothece bullosa* si tienen gran actividad. Kim, (2006)<sup>25</sup> evaluó 142 cepas cianobacterianas de diferentes cultivos de arroz en Corea para evaluar su actividad antifúngica en hongos fitopatogénicos, encontrando actividad en 9 de ellas, siendo de los géneros *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Nodularia* y *Calothrix*. Kim sugiere en su trabajo que las cianobacterias no solo contribuyen a fertilizar los campos de cultivos sino que también contribuyen manteniendo esa actividad antimicótica. Pawar et al., (2008)<sup>26</sup> evaluaron con cianobacterias halotolerantes, la mayoría del género *Oscillatoria*, la capacidad antifúngica en 4 métodos de ensayo diferentes para hacer un cribado de cianobacterias con resultados positivos. Madhumathi et al, (2011)<sup>27</sup> utilizaron especies de *Oscillatoria*, *Phomidium*, *Lyngbya*, *Chroococcus* y *Microcystis* para evaluar actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos humanos por el método de difusión en disco. Cabe destacar que los resultados varían en función del disolvente utilizado, pero presentan mayores halos de inhibición frente a la especie fúngica *Candida albicans*. Ghasemi et al, (2003)<sup>28</sup> utilizaron

cianobacterias frente a 8 hongos patógenos, de las cuales la mayoría presenta una actividad relativa utilizando un antifúngico control (Nistatina). Por otra parte, Shishido et al, (2015)<sup>21</sup> no solo evaluaron la actividad antifúngica en hongos como *Candida albicans* y *Aspergillus flavus*, sino que también identificaron dos metabolitos de dicha actividad (Scythophycinas y Hassallidinas) por medio de cromatografía y posterior caracterización secuencial de ADN.

Es decir, la mayoría de las cianobacterias estudiadas por sus notables resultados pertenecen a los géneros *Nostoc*, *Scytonema*, *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Anabaena* o *Phormidium* pero aún queda mucho por estudiar ya que hay más de 2000 especies y una inmensa variedad de especies fúngicas. Como primera premisa, es necesario poner a punto un procedimiento para evaluar la capacidad antifúngica mediante bioensayos *in vitro* adaptados a las características de los hongos filamentosos. Por tanto, el objetivo de este trabajo es poner a punto y desarrollar un procedimiento que incluya desde la extracción hasta la caracterización de los resultados para evaluar la capacidad antifúngica de diferentes especies de cianobacterias, así como también valorar a grandes rasgos los extractos obtenidos mediante espectrofotometría.

### **III. Metodología**

#### **3.1. Recolección, aislamiento y cultivo de las cianobacterias utilizadas**

Para obtener la materia prima de cianobacterias se hace una selección de especies que posteriormente se cultivaron para obtener una masa biológica suficiente en los procesos de extracción. Por otra parte, se dispuso de otras especies ya congeladas tras crecer previamente en medio líquido. Para ello se procedió a elaborar dos métodos de cultivo, en medio sólido con agar y en medio líquido mediante sistema con flujo de aire.

Los medios que se utilizaron para el crecimiento de las cianobacterias fueron BG-11<sup>29</sup> y BBM<sup>30</sup> (Bold Basal Medium sin triple nitrato) ya que son medios selectivos indicados para estas, son fáciles de preparar y se han utilizado

mucho en anteriores trabajos bibliográficos ya citados. Se prepararon 2L de cada medio en matraces de 1L de volumen. Los medios se repartieron en botellas de 500 mL con el fin de poder manipular mejor los medios tras esterilizar en autoclave (figura 5) y acelerar su enfriamiento. Para los medios sólidos se añadió a cada botella 7.4 g de Agar Bacteriológico europeo (equivalente a 15g/1L de medio) pesado en balanza de precisión (figura 6). La programación de los procesos de esterilización en el autoclave fue de un ciclo de 20 minutos a 121°C.



**Figura 5 y 6.** Autoclave y balanza de precisión utilizadas

Tras la esterilización y enfriamiento de los medios, se trasladaron a campana de flujo vertical (figura 7), la cual previamente se lavó con jabón y alcohol al 70%, se trató con luz ultravioleta y se inició el flujo diez minutos antes del procedimiento. Se esperó a que la temperatura de los medios bajara a 40°C y se agitó el medio a mano para evitar que solidificara rápidamente. Se procedió al llenado de cada placa y se apilaron hasta su enfriamiento para ser colocadas posteriormente en las bolsas de fábrica hasta su uso posterior.



**Figura 7:** campana de flujo vertical, con luz ultravioleta en marcha

La siembra se procedió dentro de la campana de flujo, al día siguiente de hacer los medios de cultivo. Se utilizó una placa como base para cortar las muestras para limpiarlas e hidratarlas con agua estéril. Se inoculó un pequeño trozo lo suficientemente grande para formar colonias y que no impidiera su crecimiento por espacio insuficiente y se extendió por toda la placa. Una vez realizado este proceso en todas las placas se cerraron todas, una por una, con parafilm. Cada vez que se cambiaba de especie se esterilizó con un mechero de alcohol etílico para evitar contaminación. El número total de placas iniciales que obtuvimos, considerando que vienen de recogida de campo, es de 29 asegurando que cada cianobacteria tiene al menos un cultivo con medio BBM y otro con BG-11. Las identificamos asignándoles un número con respecto al total de placas que se obtuvieron (figura 8).

La cámara de crecimiento vertical (Figura 9) se esterilizó con alcohol etílico 70% antes de colocar las placas en las bandejas. Las colonias se mantuvieron a una temperatura de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  a modo constante, con ciclos de luz día/noche inducidos con 3 focos de luz blanca. El orden de las placas se ha ido cambiando con el fin de evitar errores debidos a posición e incidencia de luz irregular.



**Figura 8 y 9:** Placas Petri como cultivo situadas en las bandejas de la cámara. A la derecha la cámara de crecimiento utilizada tipo GROW.

### **3.1.1. Crecimiento de las colonias:**

Una vez se introdujeron en la cámara de crecimiento, se observó el estado de las colonias en periodos regulares de aproximadamente 3 días por semana y se fue anotando cualquier indicio de crecimiento y/o contaminación en cada

placa. El tiempo total que se dejaron las placas iniciales hasta su total aislamiento por colonias fue de un mes y medio. Tras este periodo de crecimiento, se aisló todo lo que creció en cada placa para facilitar el crecimiento de las distintas colonias visibles. El aislamiento se hizo realizando el mismo procedimiento de cultivo de las placas iniciales. En la campana se introdujo una lupa binocular (figura 10) para poder identificar mejor las distintas colonias que habían crecido. A su vez, cada colonia que se aisló se recogió una pequeña cantidad y se introdujo en un portaobjetos con un cubreobjetos para ser identificadas por microscopía posteriormente.



**Figura 10:** lupa binocular con doble luz incidente.

Las nuevas placas se identificaron con un número nuevo X, separado con el número de placa de la que procedían Y quedando como X/Y su denominación. Se hizo espacio en la cámara de crecimiento y se dejaron manejando el mismo proceso de crecimiento que las iniciales. El fin de este aislamiento es el de poder identificar las colonias que se obtuvieron y usar las especies para futuras pruebas experimentales.

### **3.1.2. Cultivo en medio líquido:**

Para el cultivo en medio líquido se procedió a usar el medio BG-11, con el fin de apreciar las características morfológicas de las cianobacterias y obtener buena cantidad de material biológico. La selección de un único medio fue debida a que por cantidad de material y de especies utilizadas, se preparó para tener crecimiento en cinco medios. A su vez, el material para el montaje de los medios también se esterilizó en autoclave, a excepción de los filtros que ya vienen estériles de fábrica. Las tapas de los botes utilizados se agujerean antes del proceso de esterilización con un soldador eléctrico de estaño haciendo un

agujero que permitiera pasar una pipeta Pasteur de vidrio y otro para un filtro tipo cápsula de aire y bidireccional que permite la salida de aire y la recogida de muestra con jeringa y aguja.

La preparación del sistema de medio líquido consiste en aislar un inóculo de una colonia de cianobacteria de las muestras seleccionadas para medio sólido, y se ponen sobre un recipiente con medio líquido, aproximadamente 1/3 del bote. Ese recipiente se oxigena mediante una corriente de flujo de aire por la cual debemos asegurar esterilidad y con ello evitar contaminación. El conducto se compone de una pipeta de vidrio parcialmente sumergida en el medio, conectada a tubos de silicona. Luego se colocó entre tubo y tubo un filtro HEPA de tipo cápsula desechable y se extendió hasta diferentes conectores con el fin de tener cinco medios conectados a una bomba de aire para peceras. Todo el proceso se preparó en campana en condiciones estériles, y se aseguró un cierre óptimo de los conductos con parafilm. Cada bote se identificó con el nombre de la especie que se inoculó.

Una vez terminado todo el montaje se lleva a la cámara de crecimiento (figura 11) y se conecta la bomba para su funcionamiento. El tiempo total de crecimiento de los cinco botes se estimó hasta ver al menos una colonia desarrollada fue de tres semanas, pero se dejó el crecimiento hasta un mes para dejar que las especies con crecimiento más lento pudieran proliferar.



**Figura 11:** Montaje final de los 5 medios BG-11 de cianobacterias, situadas dentro de la cámara de crecimiento.

### 3.2. Obtención de extractos de cianobacterias

Para determinar un proceso de extracción adecuado a nuestros medios, se confeccionó una prueba con la especie *Nostoc sp.* Se elaboró un preensayo de esta especie con el fin de valorar cómo son los extractos y que se obtendrían, midiendo posteriormente en espectrofotómetro. Según anteriores trabajos, el proceso varía según el estado de la muestra biológica, su pureza, el tipo de disolvente, proceso de triturado del material, tiempo de contacto con el disolvente y método de centrifugación. En este trabajo se consideró adaptar los diferentes métodos con modificaciones pertinentes y hacer comparaciones en dos puntos del protocolo recreado de extracción<sup>21,24,25,26,27</sup>

Por una parte, se hizo una comparación con cuatro disolventes siendo el disolvente control el metanol debido a su frecuente uso en laboratorio. El segundo punto que se consideró fue el tiempo en que la muestra biológica triturada estuvo en contacto con el disolvente para así poder apreciar posteriormente por espectrofotometría los distintos puntos de absorbancia que se pudieran apreciar. Por último, se valoró hacer todo el ensayo en condiciones ambientales de máxima oscuridad posible y a temperaturas más bajas de la ambiental para evitar degradación de la muestra.

Se tuvieron varios factores en cuenta durante el procedimiento. Para los disolventes se preparó una mezcla de 75% para cada uno, con el fin de trabajar en condiciones de temperatura que evitaran con mayor facilidad la volatilidad de los disolventes. Esto es debido a que en todos los puntos del proceso es difícil mantener una temperatura de al menos menor a 15°C ya que se llevó a cabo a finales del mes de Mayo. Se hizo una prueba previa de contacto de estos con el material a utilizar para evitar errores por interferencia. Los disolventes utilizados fueron:

- Metanol 75% (disolvente utilizado como referencia)
- Etanol 75%
- Acetona 75%
- Agua destilada

El proceso de ensayo es el siguiente:

1. Trituración en mortero de las especies algales de forma enérgica, lo suficiente hasta poder romper todas las células de las muestras. Es muy importante este paso puesto que será el que permitirá sacar los metabolitos secundarios de interés y exponerlos en contacto con el disolvente.

a. Se ha considerado el origen de la muestra. Como la recogida es de campo, se ha seleccionado minuciosamente cada parte de muestra de cianobacteria, separándola de impurezas como piedras y tierra. Para optimizar la limpieza, se añade unas gotas de agua destilada. Se pesa en balanza una masa aproximada de 0.5g (Tabla 1).

2. Al triturado obtenido se le añade el disolvente poco a poco, y conforme se añade se continua la trituración. El volumen final de disolvente es aproximadamente de 10ml, por cada 0.5 g de muestra. El volumen se calcula teniendo en cuenta la cantidad inicial de material triturado que tenemos con el fin de tener también un volumen de sobrenadante suficiente para pruebas posteriores.

3. Pasar el contenido del mortero a tubos de ensayo con tapón de cierre.

4. Dejar extractos a 4°C en nevera a tiempos diferentes. Los tiempos elegidos fueron de 2:30h, 1 día y 2 días.

5. Centrifugar las muestras a 3000 rpm en 30 minutos. La velocidad máxima de la centrifugadora era de 3500 rpm, con el fin de evitar forzar al máximo esta se determinó a la velocidad indicada anteriormente.

6. Separar el sobrenadante del pellet. El sobrenadante se conserva en un tubo de ensayo nuevo y el pellet se congela para futuras pruebas. Identificamos cada tubo de ensayo rotulándolo con un número y su disolvente.

7. Congelar los botes de los sobrenadantes hasta utilizarlos posteriormente en el ensayo antifúngico.

Nº especie algal	1	2	3	4	5	6	7	8
Peso (g) ±0.01g	2.01	3.7	2.31	5.28	0.86	3.34	5.26	4.73

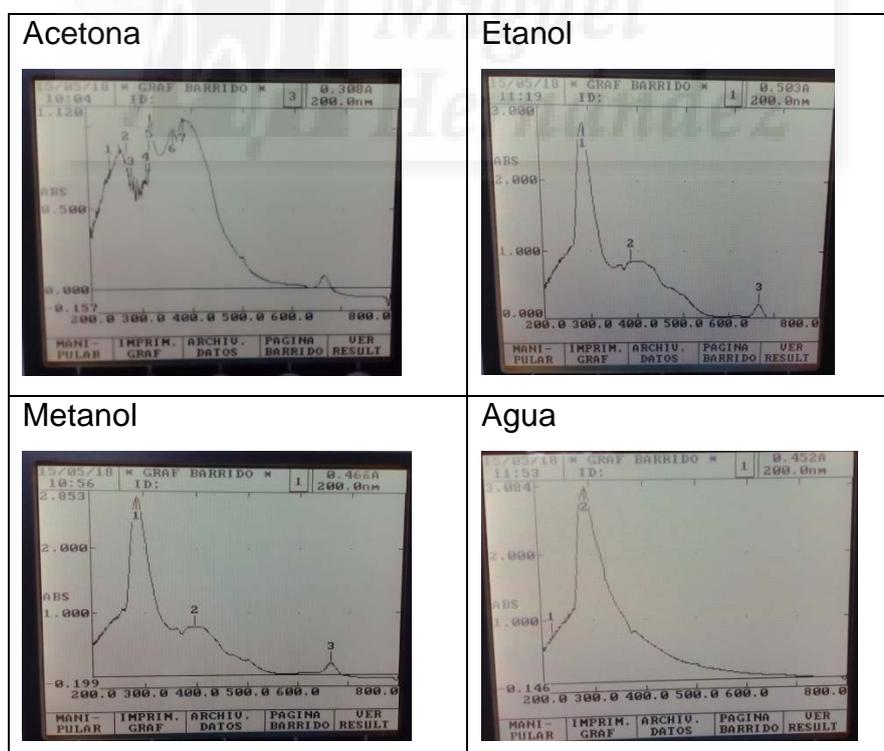
**Tabla 1:** Peso de muestra utilizada para las extracciones. Parte de la masa se conservó para congelar, dejando un peso aproximado para cada extracción de 0.5-0.7g.

### 3.3. Análisis espectrofotométrico de los extractos

Se hizo un barrido espectrofotométrico para cada extracto con su solvente con Espectrofotómetro Helios  $\alpha$ . Las características fueron de  $\lambda = 200-1100\text{nm}$  para extractos cetónicos y  $\lambda = 200-800\text{nm}$  para extractos etanólicos y acuosos con el ajuste necesario cuando fuera requerido. El blanco fue el solvente usado en el extracto determinado.

Se consideraron todos los picos gráficos obtenidos de cada extracto para evaluar de forma aproximada qué extrae cada disolvente y las absorbancias sirvieron para determinar cómo y cuánto de bien extraen. Primero se hizo una evaluación con la especie *Nostoc sp.* (tabla 2) de muestra seca y mediante la técnica de extracción descrita anteriormente se hizo un barrido por cada extracto obtenido. Primero podemos valorar macroscópicamente el estado de los extractos, como su color, que nos da una idea de la densidad que tienen.

Para obtener resultados en todo el espectro posible se elaboró un barrido desde 200nm hasta 800nm para los extractos.



**Tabla 2:** Resultados espectrofotométricos de los extractos del preensayo con *Nostoc sp.* Las imágenes están ajustadas en el eje Y según las absorbancias de los picos obtenidos.

### **3.4. Recolección, aislamiento y cultivo de los hongos utilizados**

La recolección de los hongos saprófitos utilizados en este ensayo se basó en alimentos de origen vegetal, tales como frutos de fresa, limón y naranja o bulbos como cebolla y otro material orgánico como pan. Todos ellos con indicios visibles de daños físicos o colonización fúngica incipiente. Todo el material se incubó en unas determinadas condiciones, tales como oscuridad y a temperatura ambiente de aproximadamente 24°C durante 24 horas.

Tras la incubación del material orgánico se procedió al aislamiento tras observación con lupa binocular. En condiciones de esterilidad, se tomaron con asa de Henle pequeñas porciones de hifas o esporas visibles en el material, y se colocaron en placas Petri con medio de cultivo PDA. El medio PDA se preparó previamente añadiendo 39g de agar de patata dextrosa (DIFCO ®) en 1L de disolución con agua destilada tal como describe el fabricante. El medio se esterilizó en autoclave y se procedió al llenado de placas en la campana de flujo cuando el medio estuvo a la temperatura de 45°C. Se rotularon las placas convenientemente para su identificación y se llevaron a incubar en oscuridad a temperatura ambiente de 25°C. Tras 3-7 días de incubación, dependiendo del crecimiento observado, se seleccionaron porciones de las colonias iniciales de crecimiento homogéneo y sin signos de contaminación y se repicaron en nuevas placas Petri con medio PDA. Tras haber sido aislados los hongos se conservaron a 4°C correctamente identificados para su posterior utilización.

En el caso de los hongos parásitos provenientes de colección (*Fusarium* sp. y *Phytophthora citrophthora*) se repicaron en medio PDA y se conservaron a 4°C hasta su utilización.

### **3.5. Obtención del inóculo fúngico**

Uno de los principales problemas a la hora de llevar a cabo el test de difusión en disco con hongos filamentosos es la preparación de un inóculo lo suficientemente rico para obtener un cultivo en placa homogéneo, sin el característico crecimiento en colonias propio de los hongos ya que lo que se necesita es poder apreciar con claridad los resultados de inhibición. La mayoría de los trabajos previos publicados<sup>31,32,33</sup> recomiendan seguir los métodos

estandarizados por el CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute, antes NCCLS) concretamente el documento M38-A con la propuesta metodológica para el estudio de sensibilidad a antifúngicos en hongos filamentosos<sup>34</sup>. Hemos seguido este método con algunas modificaciones.

El inóculo se preparó a partir de un cultivo de 7 días de crecimiento en medio PDA a 25 °C en lugar de a 35 °C, para evitar posibles efectos perjudiciales en el crecimiento por la elevada temperatura. Para preparar el inóculo se toman pequeñas porciones de la colonia con un asa de cultivo y se resuspenden en un tubo con 5 mL de agua estéril. Se agita en un vortex Heidoph Reax durante 10-15 segundos y se mide densidad óptica en espectrofotómetro. Se prepararon inóculos de baja y alta densidad: 2-3 o 4-5 toques del asa en el cultivo, respectivamente. Posteriormente, se moja un bastoncillo estéril en el inóculo, se aprieta por la pared del tubo para eliminar el exceso de agua y se siembra en placa en tres direcciones para asegurar la homogeneidad de crecimiento

### **3.6. Determinación de la capacidad antifúngica de los extractos de cianobacterias.**

Con el fin de poder hacer el ensayo con los extractos y medir sus propiedades antifúngicas, dividimos el procedimiento seguido en dos partes. En la primera se prepararon los inóculos fúngicos, se filtraron los extractos de las cianobacterias, los disolventes y una toxina comercial de cianobacteria.

#### **3.6.1. Selección del antifúngico control para el ensayo antifúngico por difusión de disco.**

Para seleccionar el antifúngico a usar como control en los ensayos posteriores se hizo una prueba previa en la que se pretendía comprobar la capacidad antifúngica de varios productos. Se utilizaron los productos Nistatina, Fluconazol, Oxiclورو de Cu y Fenhexamida.

Nistatina y Fluconazol se usan habitualmente en antifungibiogramas y se recomiendan como control<sup>17,25,28,31</sup>. La Nistatina es un antifúngico del grupo de los poliénicos que se obtiene a partir de *Streptomyces noursei*. Actúa por alteración de la permeabilidad de la membrana de los hongos fijándose a los

esteroles. Tiene capacidad fungicida y fungistática. Es un medicamento ampliamente utilizado en medicina humana. El Fluconazol es un antifúngico del grupo de los azoles que inhibe el citocromo P450 de la enzima 14 alfa demetilasa, la cual interviene en la formación de ergosterol que es un componente de la membrana plasmática de los hongos. Es principalmente fungistático aunque también puede actuar como fungicida. Es un medicamento ampliamente utilizado en medicina humana.

Oxicloruro de Cu y Fenhexamida son fungicidas usados en agricultura, específicamente para el tratamiento de los hongos aislados en este trabajo, por lo que se consideró interesante testar su actividad antifúngica *in vitro*. El oxicloruro de cobre es un producto mineral de fórmula  $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$  que también puede obtenerse por síntesis química. El ion Cu reacciona con las enzimas celulares del hongo, provocando la desnaturalización de las proteínas, especialmente en las fases iniciales de colonización, es decir impidiendo la germinación de las esporas y la penetración del hongo en la planta. Es un producto ampliamente utilizado en agricultura, como preventivo y fungicida en muchas enfermedades de las plantas, tales como antracnosis, alternaría, moteado, cribado, mildiu, etc. La Fenhexamida es un compuesto del grupo de las hidroxianilinas. Actúa inhibiendo el crecimiento del tubo germinativo de los hongos en la superficie de las plantas y en los primeros estadios de la colonización de la planta por parte del hongo. Es un fungicida bastante específico frente a *Botrytis* en diferentes cultivos y *Sclerotinia*.

Se realizó un test de difusión en disco para evaluar la sensibilidad de los hongos *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Phytophthora* y *Rhizopus*. Los fungicidas Nystatina y Fluconazol se aplicaron como discos de 6,5 mm de diámetro impregnados con 100 IU y 25  $\mu\text{g/g}$  de producto respectivamente de la marca BioRad®. Los fungicidas Oxicloruro de Cu 50 %, de la marca Fertiberia y Fenhexamida 50 %, de la marca Taldor®, Bayer se aplicaron cargando 25  $\mu\text{L}$  de una solución del producto sobre discos de 6 mm de papel Whatman nº 1-Grado AA, previamente esterilizados en autoclave (120°C, 20 min). Dicha solución se preparó a la concentración indicada por el fabricante (1g/400 mL de agua para Oxicloruro de Cu y 1 g/750 mL de agua para Fenhexamida) y se esterilizó por filtración en un filtro CHM de 0,45  $\mu\text{m}$ , de

la marca CHMLA. En cada placa de Petri con medio PDA previamente inoculada con el correspondiente hongo se colocaron 4 discos, uno para cada fungicida, con tres repeticiones de cada hongo. Las placas se incubaron en oscuridad a 25°C y se observaron para la presencia o no de halos de inhibición a las 72 horas

### **3.6.2. Filtrado de los extractos algales.**

Con el fin de esterilizar los extractos para el ensayo posterior se filtraron cada uno de ellos. De las ocho especies algales se utilizaron para el ensayo las que habían sido extraídas con los disolventes de etanol 75% y acetona 75% debido a que, en resultados espectrofotométricos, el agua no era un buen disolvente para extraer. El procedimiento se hizo en campana de flujo, con la máxima oscuridad posible para mantener las mismas condiciones que se realizaron en el proceso de extracción. Con una jeringa de 5ml estéril se filtró 2mL de cada extracto y pasándolos por un filtro estéril tipo HEPA desechable y se añadió cada extracto en un Eppendorf que se rotuló adecuadamente y se envolvió con papel de aluminio (figura 12). Por último, se hizo lo mismo con la toxina control y los disolventes utilizados en el proceso de extracción y se metieron todos los extractos filtrados en la nevera para conservar la temperatura de 4°C en todo momento posible.



**Figura 12:** extractos de cianobacterias tras haber sido filtrados y rotulados debidamente.

### **3.6.3. Test de sensibilidad por la técnica de difusión en disco**

Para evaluar la capacidad antifúngica de los extractos de cianobacterias obtenidos frente a diferentes hongos patógenos/oportunistas de plantas se utilizó la técnica de difusión en disco para hongos filamentosos según el

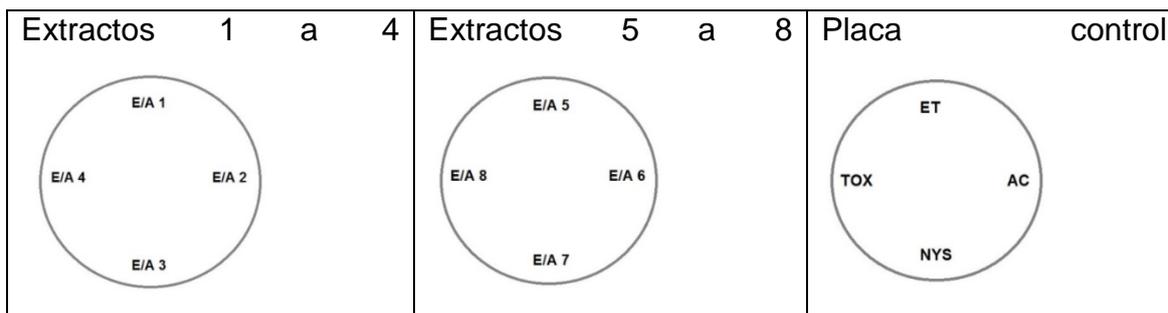
protocolo descrito por el CLSI<sup>34, 32</sup> adaptado. Se evaluaron los extractos de 8 cianobacterias (1-*Scytonema crispum*, 2-*Scytonema cf varium*, 3-*Pseudocapsa dubia*, 4-*Phormidium sp*, 5-*Geitlerinema sp*, 6- *Leptolyngbya sp*, 7-*Plectonema sp.*, 8-*Nostoc commune*), con dos extractantes o disolventes en cada caso (E-etanol, A-acetona), además de una toxina algal, frente a 6 hongos (*Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Fusarium* y *Rhizopus*); como control se utilizó el fungicida Nistatina y como blancos acetona y etanol, lo que supone un total de 20 tratamientos para cada hongo, con tres repeticiones para cada uno.

Cada inóculo fúngico utilizado en la siembra se preparó en el momento, según el método descrito anteriormente y los resultados previos obtenidos. Las suspensiones stock se prepararon a partir de cultivos de al menos 7 días en placa con medio PDA, en tubos de vidrio con 5mL de agua estéril y ajustados a una DO de 0.01-0.07 para *Alternaria*, *Aspergillus*, *Sclerotinia*, *Fusarium* y *Rhizopus* y una DO de 0.1 para *Botrytis*. Esta suspensión se agita vigorosamente en un vortex Heidoph Reax durante 10-15 segundos. Con un hisopo estéril, se impregna el inóculo, se aprieta por la pared del tubo para eliminar el sobrante y se extiende en tres direcciones por cada placa Petri. Se inoculaban 15 placas por hongo.

Para la aplicación de los extractos se utilizaron discos de 6mm de diámetro de papel Whatman tipo AA esterilizados en autoclave, e impregnados posteriormente con 25µL de cada extracto esterilizado por filtración (ya que ese volumen es perfectamente absorbido por el disco sin ver pérdidas notables). Además de los extractos, también se impregnaron discos con el mismo volumen de los disolventes y 20 µL de la toxina comercial. Para el control negativo Nistatina se utilizaron discos de 6,5 mm de diámetro impregnados con 100 IU de producto de la marca BioRad®. Los extractos, solventes, toxina y fungicida control se mantuvieron en frío hasta su uso, para evitar la evaporación.

Los discos se aplicaron con pinzas estériles en las placas preinoculadas a razón de 4 discos por placa, según el esquema realizado (figuras 13, 14) y se rotularon debidamente. Todo el procedimiento se realizaba en cabina de flujo. Entre cada cambio de hongo se espera 15 minutos con luz ultravioleta en para

esterilizar el ambiente y eliminar posibles esporas fúngicas, esterilizando los materiales en mechero de etanol y desechando el material de un solo uso. Las placas se trasladaron a un armario a una temperatura de  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ , en total oscuridad. Los resultados de crecimiento fúngico y halos obtenidos se evaluaron en los 5 días siguientes a la siembra. La observación de las placas se realizaba diariamente con luz directa incidente, a contraluz y por ambos planos de la placa, en superficie clara y en superficie negra.



**Figura 13:** Esquema de diseño experimental. E: extractos de etanol, A: extractos de acetona, ET: etanol 75% control, AC: acetona 75% control, TOX (o LH): toxina, NYS: nistatina. La siembra se realizará en el sentido de las agujas del reloj empezando desde la designación superior de la placa en el dibujo (en la placa se indicó con una marca el inicio).



**Figura 14:** Imagen del puesto de trabajo en cabina de flujo para la implantación del método de difusión en agar. Al fondo a la derecha se aprecia un esterilizador por calor cilíndrico eléctrico. Las 15 placas Petri con PDA ya están disponibles para la primera siembra. Al fondo los tubos de ensayo con el inóculo fúngico y a la izquierda los Eppendorf con los extractos, junto con el resto del material pertinente.

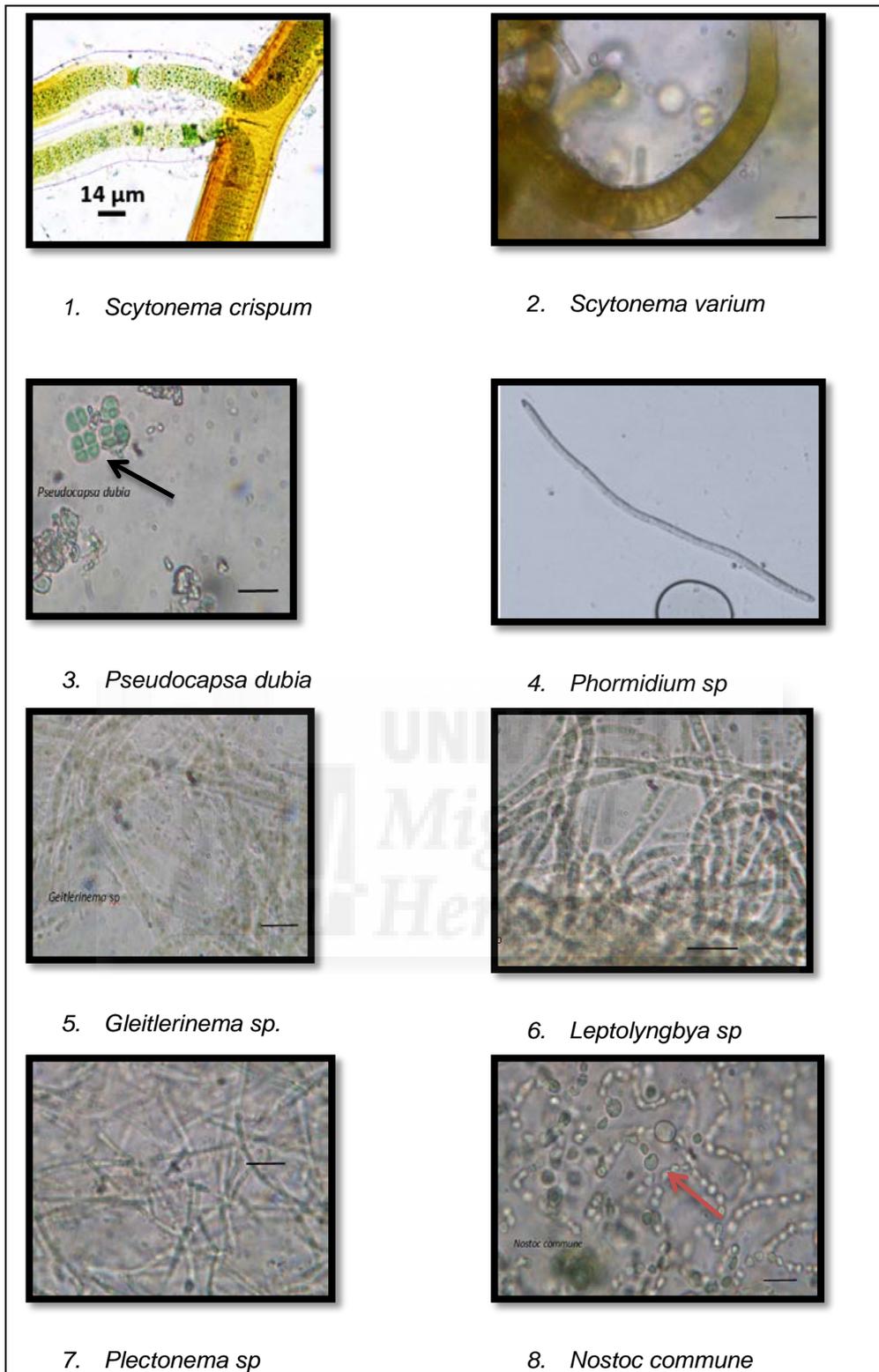
## IV. Resultados y Discusión

### 4.1. Cianobacterias aisladas y de colección utilizadas

La identificación es provisional y basada en características morfológicas vistas a nivel microscópico (tabla 3). Para poder confirmar la identificación se ha de proceder posteriormente a técnicas analíticas moleculares.

Nº extracto	Cepa	Identificación	Hábitat	Procedencia	Estado de la materia prima
1	UMHCC10	<i>Scytonema crispum</i>	Dulceacuícola, sobre mortero, hierro y madera	Noria Grande de Abarán (MU)	Especie algal recolectada y secada
2	UMHCC22	<i>Scytonema cf varium</i>	Aerofítica, en piedra caliza	Molino de mano de Altorreal (MU)	Especie algal recolectada y secada
3	UMHCC41	<i>Pseudocapsa dubia</i>	Aerofítica, en recipientes de barro	Bases de macetas en Altorreal (MU)	Especie algal recolectada y secada
4	UMHCC43	<i>Phormidium sp</i>	Dulceacuícola, en arroyo de alta montaña	Barranco de San Juan, Sierra Nevada (GR)	Especie algal procedente de cultivo líquido
5	UMHCC48	<i>Geitlerinema sp</i>	Dulceacuícola, en embalses	Azud de Ojós (MU)	Especie algal procedente de cultivo líquido
6	UMHCC50	<i>Leptolyngbya sp</i>	Casmoendolítica, en costras yesíferas	Zarcilla de Ramos, Lorca (MU)	Especie algal procedente de cultivo líquido
7	UMHCC55	<i>Plectonema sp</i>	Edáfica, en suelos margosos	Pantano de Elche (A)	Especie algal procedente de cultivo líquido
8	UMHCC59	<i>Nostoc commune</i>	Edáfica, en suelos calizos	Campus de Elche (A)	Especie algal procedente de cultivo líquido

**Tabla 3:** Identificación y procedencia de las especies de cianobacterias utilizadas para la obtención de los extractos.



**Figura 15:** Imágenes microscópicas de las cianobacterias empleadas. Se les asigna un número del 1 al 8 para identificarlas cuando se elaboraron los extractos.

### Características morfológicas de las especies empleadas en laboratorio:

Macroscópicamente son colonias que hidratadas presentaban una forma mucilaginosa y laminar, sobre todo en las especies cultivadas. Los colores variaban según la especie, 1 y 8 (figura 15) presentaban colores pardo-negruzcos, 4 (figura 15) presentaba un color marrón-rojizo, 2 y 3 (figura 15) un pardo verdoso más tenue, 5 (figura 15) se podía apreciar un color azul verdoso oscuro, mientras que 6 y 7 (figura 15) presentaban tonalidades verdes más vistosas. Además, el color se podía apreciar mucho mejor en los extractos. Microscópicamente, la mayoría de las especies presentan formas filamentosas a excepción de *Pseudocapsa dubia* que tiene forma cocal (figura 15). En todas las fotografías se presenta una línea que indica un tamaño aproximado de 14µm como se indica en la primera.

Otras estructuras especiales se pueden apreciar mejor por ejemplo en la especie *Nostoc commune*, varios heterocitos, cuya forma es oval y de un tamaño aproximado a 5-6µm (indicado por la flecha en figura 15).

#### **4.2. Optimización de la obtención de los extractos y su caracterización**

Como consecuencia de los resultados del preensayo con *Nostoc* sp, se determinaron las características del protocolo para la obtención de los extractos de las cianobacterias utilizadas. Teniendo en cuenta el tiempo de extracción, dejamos actuar 1 día el proceso en nevera a 4°C manteniendo la mayor oscuridad posible. El metanol se descartó como disolvente ya que se consideró no apropiado para el empleo de los extractos en futuros usos agroalimentarios.

Para poder valorar la sensibilidad o resistencia de los hongos debemos saber si en los extractos realizados de las 8 cianobacterias se pueden encontrar posibles metabolitos de interés farmacológico.

De los disolventes utilizados, con la acetona se obtienen más cantidad de picos (Tabla 4), que podría equivaler a mayor número de metabolitos extraídos, seguido del etanol y del agua. Dado que no hay mucha información acerca de espectrometría para metabolitos con actividad biocida, no se puede relacionar con total seguridad qué se ha podido extraer hasta que no se haya hecho otro análisis como por ejemplo una cromatografía, que está más estandarizada y es

más usada. Se puede deducir a partir de la Tabla 5 que es posible que se hayan extraído primariamente pigmentos como ficocianina, clorofila a, alguna posible scytonemina con las especies de *Scytonema* (extractos 1 y 2) debido a que tienen picos dentro del rango marcado en la tabla y algunas posibles MAAs.

Extractos	Longitudes de onda de los picos obtenidos de los extractos (nm)		
	Acetona	Etanol	Agua
1	212,339,385,660,804	215,323,433,665	216,384
2	210,272,338,401,674,802,1087	216,264,313,443,665	209,384
3	211,265,333,384,1005	218,320,417	218
4	211,294,351,417,643,1005,1087	218,414,665	-
5	212,264,287,349,410,674,804,1005	219,436,666	-
6	211,268,296,333,415,482,672,1005	219,478,665	-
7	210,291,424,670,1005,1093	219,474,664	219,385
8	205,294,341,388,667,802,1087	215,294,359,433,662	217

**Tabla 4:** picos obtenidos de espectrofotometría de los extractos cianobacterianos 1 a 8.

Pigmento o Metabolito	Rango de luz absorbida aproximada (nm)	
	UV	Visible
Ficobilinas (ficoeritrina y ficocianina)		560 y 620
Clorofila a		435 y 680
Scytoneminas	315-400	
MAAs	310-359	

**Tabla 5:** Muestra de algunos ejemplos de picos de absorbancia. En este caso son pigmentos que libera con mayor facilidad la cianobacteria cuando se hace una extracción.<sup>1</sup>

### 4.3. Hongos aislados y de colección utilizados

En la tabla 6 se muestra el listado de los hongos utilizados en este trabajo, su procedencia y asignación taxonómica provisional hasta confirmación mediante técnicas moleculares. Todos los hongos aislados de material vegetal pueden ser considerados como mohos, siendo éste un término de uso general que no corresponde a ninguna categoría taxonómica concreta y que incluye hongos saprófitos cuyas esporas se producen en gran cantidad y se encuentran habitualmente en el aire. Su facilidad para colonizar sustratos orgánicos o de otro tipo y digerirlos debido a la intensa actividad enzimática con

enzimas proteolíticos, lipídicos y glucídicos les convierte en uno de los principales problemas sanitarios en almacenamiento de frutas. Además, algunas especies de mohos producen toxinas y otras sustancias que pueden provocar problemas en el sistema respiratorio, irritación de ojos y otros daños en las personas.<sup>31</sup>

Cepa	Identificación provisional	Procedencia	Tipo trófico
UMH18007	<i>Alternaria sp.</i>	Frutos de <i>Citrus x limon</i> (limón)	Saprófito
UMH18005	<i>Aspergillus niger</i>	Bulbos de <i>Allium cepa</i> (cebolla)	Saprófito
UMH18008	<i>Botrytis cinerea</i>	Frutos de <i>Fragaria virginiana</i> (fresa)	Saprófito
UMH18009	<i>Sclerotinia sp.</i>	Frutos de <i>Fragaria virginiana</i> (fresa)	Saprófito
	<i>Fusarium sp.</i>	Colección de cultivos del CEBAS-CSIC, Murcia Proporcionado por Dr. JA. Pascual	Parásito
	<i>Phytophthora citrophthora</i>	Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Valencia.	Parásito
UMH18006	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Pan	Saprófito

**Tabla 6:** Identificación provisional y procedencia de los hongos utilizados en el ensayo

Características morfológicas de los hongos utilizados<sup>23,35</sup>:

*Alternaria sp.* Forma colonias blanquecinas, planas y vellosas. Las colonias tras 4-5 días empiezan a presentar tonos de color café, dejando un halo blanquecino alrededor. Conidióforos y conidios pardos, en cadenas, con septos transversales y longitudinales. *Aspergillus niger*, es un hongo de fácil cultivo cuyos conidióforos simples globosos de tonalidad negra. Tanto el micelio como las estructuras aéreas son muy densos, casi ocupando con facilidad toda la placa cuando se cultiva. *Botrytis cinérea* forma colonias densas y oscuras, de ahí la denominación podredumbre gris. Conidióforos ramificados de color gris. *Sclerotinia sp.* es un hongo de colonias blanquecinas muy pálidas, vellosas y planas. Tienen crecimiento más débil con respecto a los demás hongos utilizados. Forma esclerocios oscuros en cultivo por agregación densa de las hifas. *Fusarium sp.* forma colonias algodonosas de color blanco situadas como una superficie plana. Conidióforos en forma de huso, transparentes, septados

transversalmente. *Phytophthora citrophthora* es un hongo que suele infectar la superficie de los frutos. Se presenta en superficie de color marrón café, en cultivo forma colonias blanquecinas, con hifas aseptadas y esporangióforos aéreos transparentes. *Rhizopus stolonifer* forma en principio un micelio blanquecino que luego se torna marrón, con hifas aseptadas, de las cuales salen a la parte aérea los esporangióforos, que se aprecian como puntos negros protuberantes sobre el micelio. Se conoce como el moho del pan.

#### 4.4. Optimización de la obtención del inóculo fúngico

Para todos los hongos ensayados se obtuvo un crecimiento homogéneo a las dos densidades probadas, baja y alta, que permite la realización del test de sensibilidad por la técnica de difusión en disco excepto en el caso de *Botrytis cinerea* a la menor densidad, en la que se podían diferenciar las colonias, y en *Phytophthora* a la menor densidad que apenas produjo crecimiento. Según el protocolo M38-A se recomienda un inóculo de partida con una concentración de UFC/mL del orden de  $10^6$ . Como el color, tamaño y densidad de las hifas y conidios es distinto para cada especie, la densidad óptica para obtener dicha concentración también lo es. De trabajos previos<sup>32</sup> se sabe que para *Aspergillus*, *Fusarium* y *Rhizopus* se obtiene con una densidad óptica de 0,09-0,17, aunque para otras especies como *Bipolaris* o *Penicillium* es de hasta 0,3 y para otras como *Phytophthora*, *Botrytis* o *Sclerotinia* no existen datos previos. Por ello, decidimos una DO de 0,1 mínimo para todos los hongos (Tabla 7).

	DO baja densidad	Crecimiento homogéneo	DO alta densidad	Crecimiento homogéneo
<i>Alternaria sp.</i>	0,02	+	0,12	+
<i>Aspergillus niger</i>	0,07	+	0,13	+
<i>Botrytis cinerea</i>	0,04	-	0,15	+
<i>Sclerotinia sp.</i>	0,06	+	0,11	+
<i>Fusarium sp.</i>	0,01	+	0,19	+
<i>Phytophthora citrophthora</i>	0,01	-	0,10	+
<i>Rhizopus stolonifer</i>	0,05	+	0,13	+

**Tabla 7:** Resultados de densidad óptica (absorbancias) y crecimiento en placa Petri con medio PDA para los inóculos preparados para cada hongo.

#### 4.5. Selección del antibiótico control

El fungicida Nistatina mostró un efecto inhibitorio del crecimiento en todos los hongos, excepto en *Phytophthora*. (Figura 16, Tabla 8). El fungicida Fluconazol solo mostró una leve acción inhibitoria en *Alternaria*. Contrariamente a lo esperado, a excepción de Oxiclورو de Cu que únicamente inhibió el crecimiento de *Sclerotinia*, los fungicidas usados en agricultura no ejercieron efecto inhibitorio sobre los hongos en el ensayo *in vitro* realizado. Esto pudo deberse a que la esterilización por filtración retuviera las moléculas responsables de la acción fungicida, o bien a que sea necesario utilizar una dosis más alta que la recomendada por el fabricante para los ensayos realizados *in vitro*. Por ello, se decidió usar Nistatina para los posteriores ensayos.



**Figura 16:** Efecto de antifúngicos comerciales (Nistatina, Fluconazol, Oxiclورو de Cu y Fenhexamida) sobre el crecimiento de distintos hongos filamentosos en medio PDA. Las flechas señalan el halo de inhibición provocado por Nystatina en todos los casos, Fluconazol en *Alternaria* y oxiclورو de Cu en *Sclerotinia*.

Hongo	Fungicida			
	Nystatina	Fluconazol	Oxicloruro Cu	Fenhexamida
<i>Aspergillus</i>	+	-	-	-
<i>Alternaria</i>	+	+	-	-
<i>Botrytis</i>	+	-	-	-
<i>Sclerotinia</i>	+	-	+	-
<i>Fusarium</i>	+	-	-	-
<i>Phytophthora</i>	-	-	-	-
<i>Rhizopus</i>	+	-	-	-

**Tabla 8:** Efecto inhibitorio de antifúngicos comerciales (Nistatina, Fluconazol, Oxicloruro de Cu y Fenhexamida) sobre el crecimiento de distintos hongos filamentosos en medio PDA (+: hay inhibición; -: no hay inhibición).

#### 4.6. Capacidad antifúngica de los extractos de cianobacterias

##### Evolución de los halos de inhibición (figura 17).

Revisión de *Alternaria sp*: El primer día tras el cultivo no se apreciaba crecimiento notable. El segundo día se observó crecimiento en colonias sin apreciar bien los halos. El tercer día las colonias se habían expandido más por la placa, pero no se apreciaba crecimiento homogéneo total. Sólo se detectaban halos en los discos de Nystatina, los cuales se midieron y se delimitaron con un rotulador. A los 5 días el crecimiento del hongo era homogéneo en la placa, pero no se observaron cambios en los halos de inhibición.

Revisión de *Aspergillus niger*: En el primer día tras el cultivo, el hongo ya estaba casi disperso por la placa de cultivo. Al segundo día el crecimiento ya era completo. Se apreciaba sensibilidad en los discos de Nystatina y se podía ver una zona negra en la parte superficial de toda la placa, perteneciente a las formas aéreas del hongo o conidióforos con conidios. Aparentemente el micelio no crecía bien alrededor de los discos con extractos de etanol, dando indicios de posible resultado positivo, pero las formas aéreas sí cubrían encima de todos los discos. Al tercer día el micelio ya cubría toda la placa. El halo de

Nystatina se conservaba, pero los conidios ya empezaban a cubrir toda la placa.

Revisión de *Botrytis cinerea*: No se apreciaba crecimiento hasta el segundo día, quedando homogéneo en casi todas las placas de las quince cultivadas. Al tercer día ya se podía apreciar halos de inhibición bien marcados solo en Nystatina.

Revisión de *Sclerotinia sp*: El crecimiento comenzó el segundo día, cuando ya podía apreciarse expansión homogénea total. Al tercero se midió los halos de inhibición de Nystatina pudiendo observar también que, en los discos con los extractos de etanol, el crecimiento del hongo alrededor era de una densidad menor con respecto a otras placas de cultivo pero no se apreciaba un halo claro (figura 17, tabla 9). Descartamos que fuera efecto del disolvente ya que no se apreció con el disco de etanol. Cabe destacar que es el hongo que presenta mayor sensibilidad en el estudio.

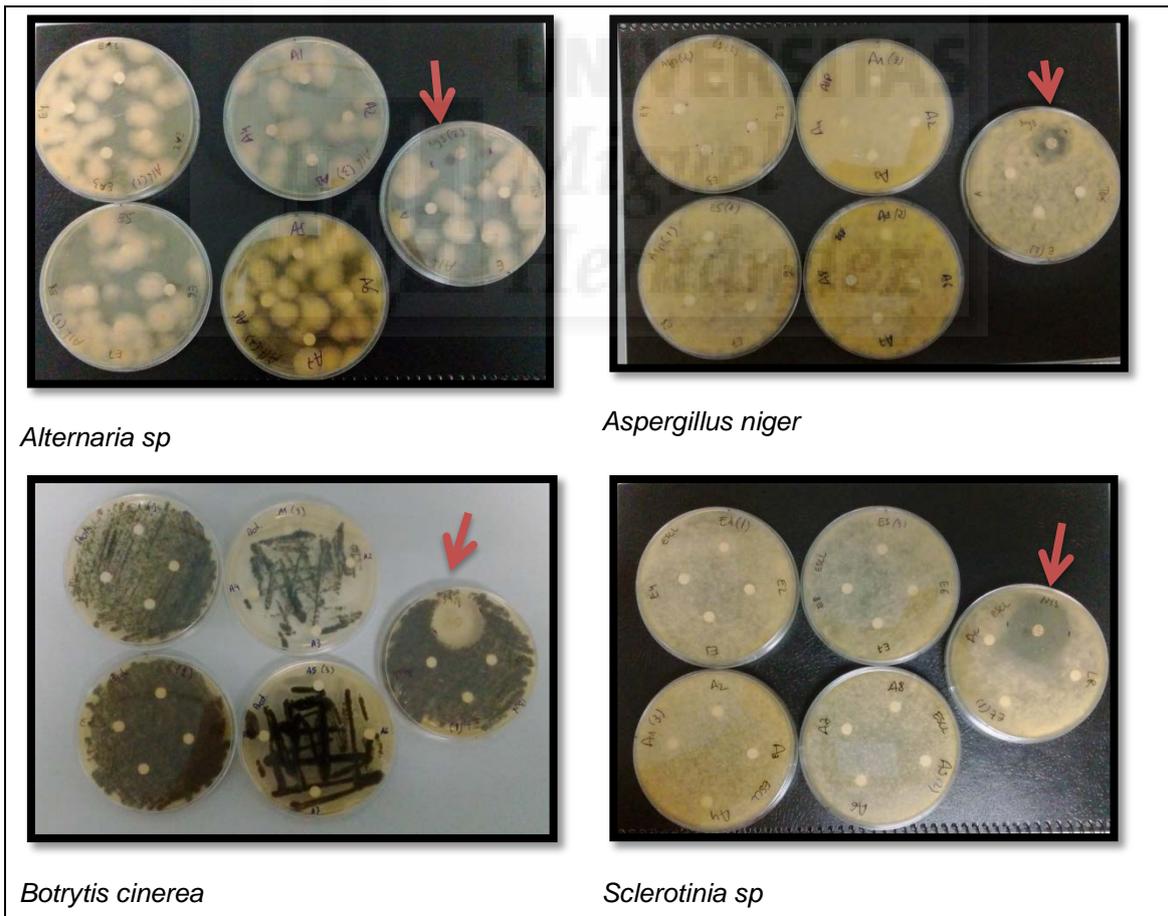
Revisión de *Fusarium sp*: El crecimiento empezó a apreciarse a partir del segundo día, quedando las placas con notable homogeneidad de todo el micelio fúngico. Solo respondía con inhibición del crecimiento frente a la Nystatina.

Revisión de *Rhizopus stolonifer*: Tenue crecimiento el primer día, quedando por completo a partir del segundo alcanzando un micelio muy denso. En el tercero se podían apreciar puntos negro pertenecientes a los esporangióforos. Presenta también sensibilidad a la Nystatina pero el micelio parece capaz de superar el efecto inhibitorio empezando a cubrir el halo a partir del tercer día.

En general no se observó actividad antifúngica con los extractos de cianobacterias ensayados, excepto una leve inhibición del crecimiento de *Sclerotinia*. Esto pudo deberse a la carencia de actividad antifúngica o también a algunos aspectos metodológicos como que la concentración del extracto fuera demasiado baja para provocar efecto en los hongos, a que la cantidad usada en el disco fuera muy baja o la naturaleza y eficacia del solvente para extraer los compuestos activos. Otros autores <sup>21,25</sup> han detectado capacidad antifúngica con alguna de las cianobacterias usadas aquí como *Nostoc* pero

con extractos en metanol y éter petróleo y una dosis mucho mayor (100  $\mu$ L). Sin embargo, dado que el objetivo final de esta investigación es la aplicación en productos alimentarios, nosotros hemos preferido usar extractantes menos nocivos.

El método utilizado parece ser apropiado para evaluar la capacidad antifúngica, pues en todos los casos el control con el fungicida Nystatina produjo halos de inhibición; es un método sencillo, relativamente rápido y factible de utilizar con un equipamiento mínimo. El uso del medio de cultivo PDA permite el crecimiento de los hongos filamentosos en la forma habitual. Aunque existe cierta controversia sobre los métodos y varios los trabajos en los que se comparan metodologías,<sup>37,33</sup> el método de difusión de disco es el más recomendado. Sin embargo, puede ser necesario hacer algunas modificaciones.





**Figura 17:** Evaluación de la capacidad antifúngica de extractos en etanol y acetona de ocho especies de cianobacterias mediante la técnica de difusión de disco en medio PDA a los 3 días del inicio del cultivo. La flecha indica el halo obtenido por el control Nistatina.

Halos de inhibición (cm)	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Sclerotinia sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
E1	-	-	-	±	-	-
E2	-	-	-	±	-	-
E3	-	-	-	±	-	-
E4	-	-	-	±	-	-
E5	-	-	-	±	-	-
E6	-	-	-	±	-	-
E7	-	-	-	±	-	-
E8	-	-	-	±	-	-
A1	-	-	-	-	-	-
A2	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	-	-
A4	-	-	-	-	-	-
A5	-	-	-	-	-	-
A6	-	-	-	-	-	-
A7	-	-	-	-	-	-
A8	-	-	-	-	-	-
Etanol	-	-	-	-	-	-
Acetona	-	-	-	-	-	-
Nystatina	2.9/3.3/3.4	1.5/2.1/1.8	2.9/3.2/2.9	3.5/3.4/3.5	1.7/1.4/1.8	0.9/1.0/1.0
TOX	-	-	-	-	-	-

**Tabla 9:** Medición de halos a las 72h desde el inicio del cultivo. (-) indica resistencia; (±) indica leve inhibición, pero sin apreciar un halo claro y definido. Se indican los resultados de las tres repeticiones. La medida incluye el diámetro del disco.

## V. Conclusiones y Proyección futura

Dados los objetivos propuestos, consistentes en hallar actividad antifúngica en diferentes especies de cianobacterias mediante un método de extracción que optimizara la obtención de metabolitos secundarios y desarrollar un método para evaluar dicha actividad, se puede concluir que:

- El método de extracción llevado a cabo permite extraer ciertos compuestos todavía no identificados y se puede llevar a cabo fácilmente en un laboratorio sencillo.
- El método de difusión de disco en agar es adecuado para evaluar la capacidad antifúngica sobre hongos filamentosos patógenos y oportunistas de tipo moho.
- La actividad antifúngica no ha podido demostrarse con evidencia en los ocho extractos cianobacterianos frente a los seis hongos seleccionados bajo las condiciones ambientales descritas, por lo que se plantean algunas modificaciones del método para el futuro.

Los extractos etanólicos parecen tener una leve repercusión en el crecimiento de *Sclerotinia* sp., afectando a la densidad del micelio. Por ello, se proponen algunas modificaciones con respecto al ensayo establecido y al método de extracción:

- Valorar un método de trituración más efectivo que el mortero, por ejemplo con un sonicador ultrasónico. Se puede asegurar la rotura celular de las muestras ampliando el tiempo de éste.
- Utilizar mezclas de solventes o utilizar solventes apolares en combinación.
- Aplicar tratamiento a la muestra inicial, por ejemplo la liofilización
- Valorar la utilización de otras especies cianobacterianas y/o fúngicas
- Hacer pruebas de inhibición por concentración mínima. En el ensayo se ha valorado una alícuota de 25  $\mu$ L. Se podría aplicar un método de concentración teniendo en cuenta el disolvente utilizado.

Por último, se podría catalogar y valorar la identificación de los resultados obtenidos en espectrofotometría, por ejemplo con una cromatografía HPLC ya

que es el método más utilizado en ensayos anteriores y el mejor estandarizado para compuestos cianobacterianos. Aunque las especies no hayan demostrado en estas condiciones actividad antifúngica, siempre se puede estudiar otras actividades biocidas que puedan presentar.

## **VI. Bibliografía.**

1. Ecology of Cyanobacteria. Their Diversity in Space and Time. Ed Whitton, Brian A.; Summary, Page 1. Edt Springer Netherlads; 2012.
2. Oren A. (2012) Salts and Brines. In: Whitton B. (eds) Ecology of Cyanobacteria II. Springer, Dordrecht. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3\\_15](https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_15)
3. William Schopf J. Fossil evidence of Archaean life. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2006 Jun 29; doi: 10.1098/rstb.2006.1834.
4. Schirmer B.E., de Vos J.M., Antonelli A., and Bagheri H.C.; Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jan 29; 110(5): 1791–1796. doi: 10.1073/pnas.1209927110.
5. Imagen: Stromatolites in Hamelin Pool, Shark Bay WA. Updated 11 Nov 2011, 2:19am. Disponible en: <http://www.abc.net.au/news/2011-11-11/stromatolites.jpg/3660546>.
6. Paerl H.W. (2012) Marine Plankton. In: Whitton B. (eds) Ecology of Cyanobacteria II. Springer, Dordrecht. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_5)
7. Sinang S.C., Poh K.B., Shamsudin S., Sinden A.; Preliminary Assessment of Cyanobacteria Diversity and Toxic Potential in Ten Freshwater Lakes in Selangor, Malaysia. Bull Environ Contam Toxicol. 2015 Oct;95(4): 542-7; doi: 10.1007/s00128-015-1620-7.
8. Yu L., Kong F., Zhang M., Yang Z., Shi X., Du M.; The dynamics of microcystis genotypes and microcystin production and associations with environmental factors during blooms in Lake Chaohu, China; Toxins (Basel); 2014 Dec 2;6(12): 3238-57; doi: 10.3390/toxins6123238.
9. Cohen Y., Jørgensen B.B., Revsbech N.P., Poplawski R.; Adaptation to Hydrogen Sulfide of Oxygenic and Anoxygenic Photosynthesis among

Cyanobacteria. Appl Environ Microbiol. 1986 Feb;51(2): 398-407; PMID: 16346996

10. Domozych D.S., Ciancia M., Fangel J.U., Mikkelsen M.D., Ulvskov P., and William G.T. Willats; The Cell Walls of Green Algae: A Journey through Evolution and Diversity. Front Plant Sci. 2012; 3: 82; doi: 10.3389/fpls.2012.00082.

11. Sinha R.P., Klisch M., Helbling E.W., Häder D.; Induction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in cyanobacteria by solar ultraviolet-B radiation. J Photochem Photobiol B. 2001 Jul;60(2-3):129-35; DOI: [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00137-3](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00137-3)

12. Biodiversidad y Taxonomía de Plantas criptógamas. Cyanophyta. Universidad Complutense de Madrid. Última consulta: 27 de mayo.

13. Garro Mora B.G. Cianobacterias: Estructuras particulares. Escuela de Biología. Sección de biología Evolutiva y Sistemática. UCR. Disponible en: <http://www.biologia.ucr.ac.cr/profesores/Garro%20Bernal/Biologia%20Celular%20y%20Molecular%20de%20Bacterias/TEMA%209%20BIOLOGIA%20CELULAR%20DE%20CIANOBACTERIAS%20HETEROCISTOS.pdf>

14. Kumar K., Mella-Herrera R.A., Golden J.W.; Cyanobacterial Heterocysts. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010 Apr; 2(4): a000315. DOI: 10.1101/cshperspect.a000315.

15. Martín Sánchez I. Diversidad Microbiana y Taxonomía. Bacterias Fotosintéticas. Departamento de Microbiología de la UGR. Última consulta: 27 de mayo 2018.

16. Haque F., Banayan S., Yee J, Chiang Y.W.; Extraction and applications of cyanotoxins and other cyanobacterial secondary metabolites. Chemosphere, Volume 183, September 2017, Pages 164-175.

17. Ramesh Babu M., Malathi T. and Digamber Rao B.; Antifungal Activity of Selected Cyanobacteria Against Fungal Pathogens. International Journal of Pharmacy and Biological Sciences. IJPBS | Volume 7 | Issue 4 | OCT-DEC| 2017 | 207-213.

18. Hayashi K., Hayashi T., Kojima I.; A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: in vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus

activities. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996 Oct 10;12(15):1463-71; DOI: <https://doi.org/10.1089/aid.1996.12.1463>

19. Gerwick W.H., Proteau P.J., et al; Structure of Curacin A, a Novel Antimitotic, Antiproliferative and Brine Shrimp Toxic Natural Product from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*; *J. Org. Chem.*, 1994, 59 (6), pp 1243–1245; DOI: 10.1021/jo00085a006.

20. Loeffler J., Stevens D.A.; Antifungal Drug Resistance; *Clinical Infectious Diseases*, Volume 36, Issue Supplement\_1, 15 January 2003, Pages S31–S41; DOI: <https://doi.org/10.1086/344658>.

21. Shishido T.K., Humisto A., Jokela J., Liu L., Wahlsten M., Tamrakar A., et al; Antifungal Compounds from Cyanobacteria; *Mar Drugs*. 2015 Apr; 13(4): 2124–2140. DOI: 10.3390/md13042124;

22. Swain S., Paidesetty S.K., Padhy R.N.; Antibacterial, antifungal and antimycobacterial compounds from cyanobacteria; *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 90, June 2017, Pages 760-776.

23. Moore D.; Robson G.D.; Trinci A.P.J. (editors). (2011). 21st Century Guidebook to Fungi (1<sup>a</sup> edición). Cambridge University Press. ISBN 978-0521186957.

24. Kumar M., Kumar Tripathi M., Srivastava A., Kumar Gour J., Kumar Singh R., Tilak R., et al; Cyanobacteria, *Lyngbya aestuarii* and *Aphanothece bullosa* as antifungal and antileishmanial drug resources; *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013 Jun; 3(6): 458–463. doi: 10.1016/S2221-1691(13)60096-9

25. Kim J.D.; Screening of Cyanobacteria (Blue-Green algae) from Rice Paddy Soil for Antifungal Activity against Plant Pathogenic Fungi; *Mycobiology*. 2006 Sep; 34(3): 138–142.; doi: 10.4489/MYCO.2006.34.3.138

26. Pawar, S.T. & Puranik, P.R; Screening of terrestrial and freshwater halotolerant cyanobacteria for antifungal activities; *World J Microbiol Biotechnol* (2008) 24: 1019. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9565-6>

27. Madhumathi V., Deepa P., Jeyachandran S., et al; Antimicrobial Activity of Cyanobacteria Isolated from Freshwater Lake; *International Journal of Microbiological Research* 2 (3): 213-216, 201; ISSN 2079-2093

28. Ghasemi Y., Tabatabaei Yazdi M., Shokravi S., Soltani N., and Zarrini G.; Antifungal and antibacterial activity of paddy-fields cyanobacteria from North of

Iran; Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran 14(3): 203-209 (2003); University of Tehran, ISSN 1016-1104.

29. Sammlung von Algenkulturen Göttingen, Culture Collection of Algae; Medium Vers: 05.2013. BG-11 medium for cyanobacteria. Disponible en: [http://sagdb.uni-goettingen.de/culture\\_media/20%20BG11%20Medium.pdf](http://sagdb.uni-goettingen.de/culture_media/20%20BG11%20Medium.pdf)

30. Sammlung von Algenkulturen Göttingen, Culture Collection of Algae; Medium Vers: 10.2008. Bold Basal Medium for cyanobacteria. Disponible en: [http://sagdb.unigoettingen.de/culture\\_media/26%20Bold%20Modified%20Basal%20Medium.pdf](http://sagdb.unigoettingen.de/culture_media/26%20Bold%20Modified%20Basal%20Medium.pdf)

31. Soltani N., Khavari-Nejad R.A., Tabatabaei Yazdi M., Sh. Shokravi & Fernández-Valiente E. (2005) Screening of Soil Cyanobacteria for Antifungal and Antibacterial Activity, *Pharmaceutical Biology*, 43:5, 455-459, DOI: 10.1080/13880200590963871

32. Cantón, E., Martín, E., Espinel-Ingroff, A. 2007. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A. *Revista Iberoamericana de Micología*, capítulo 15.

33. López-Oviedo E., Aller A.I., Martín C., Castro C., Ramirez M., Pemán J.M., Cantón E., Almeida C., Martín-Mazuelos E. 2006. Evaluation of Disk Diffusion Method for Determining Posaconazole Susceptibility of Filamentous Fungi: Comparison with CLSI Broth Microdilution Method E. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(3): 1108-1111

34. National Committee for Clinical Laboratory Standards.2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard document M38-A. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pa. Vol. 22 No. 16.

35. Mycobank. Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks.Última consulta: 28 de junio 2018. Disponible en: Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks

36. Gupta P., Khare V., Kumar D., Ahmad A., Banerjee G., Singh M. 2015. Comparative Evaluation of Disc Diffusion and E-test with Broth Micro-dilution in Susceptibility testing of Amphotericin B, Voriconazole and Caspofungin against Clinical *Aspergillus* isolates. *J Clin Diagn Res.* 9(1): DC04-7. doi: 10.7860/JCDR/2015/10467.5395.

37. Martos A.I., Martín-Mazuelos E., Romero A., Serrano C., González T., Almeida C., Puche B., Cantón E., Pemán J., Espinel-Ingroff A. 2012. Evaluation of disk diffusion method compared to broth microdilution for antifungal susceptibility testing of 3 echinocandins against *Aspergillus* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 73(1):53-6. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.01.006.

