

TESIS DEFENDIDA POR  
**Ceres Anabel Molina Cárdenas**  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

---

*Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra*  
*Director del Comité*

---

Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida  
*Miembro del Comité*

---

Dr. Manuel Alberto Segovia Quintero  
*Miembro del Comité*

---

Dra. Beatriz Cordero Esquivel  
*Coordinador del programa de posgrado*  
*en Ciencias en Acuicultura*

---

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales  
*Director de Estudios de Posgrado*

19 de Septiembre de 2011

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
EN ACUICULTURA**

---

**EFFECTO INHIBITORIO DE DIFERENTES ESPECIES DE MICROALGAS SOBRE  
*VIBRIO* spp.**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

**CERES ANABEL MOLINA CARDENAS**

Ensenada, Baja California, México, Septiembre 2011

**RESUMEN** de la tesis de **Ceres Anabel Molina Cárdenas**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Acuicultura. Ensenada, Baja California. Septiembre de 2011.

### **Efecto inhibitorio de diferentes especies de microalgas sobre *Vibrio* spp.**

Resumen aprobado por:

---

M. del Pilar Sánchez Saavedra  
Director de Tesis

Se evaluó la capacidad inhibitoria de siete especies de microalgas contra las bacterias patógenas *Vibrio alginolyticus*, *V. campbellii* y *V. harveyi*. Las especies de microalgas utilizadas fueron *Isochrysis galbana* CCMP, *Navicula incerta*, *Nitzschia laevis*, *Navicula byskanterae*, la Cepa 2B, *Nitzschia frustulum* var. *perminuta* y la Cepa 5B. De cada especie de microalga se realizaron cultivos mono-específicos por triplicado en medio "f" a una densidad inicial de  $1 \times 10^5$  células/ml, los cuales fueron inoculados con una concentración  $\geq 1 \times 10^2$  de bacterias que crecen en medio TCBS (BTCBS)/ml de cada especie por separado. Se realizaron conteos diarios de los cultivos de microalgas y se calculó su tasa de crecimiento. Para evaluar la capacidad inhibitoria de los cultivos de microalgas se realizaron conteos de bacterias heterotróficas en medio ZoBell y bacterias que crecen en medio TCBS (BTCBS) a los tiempos T0+1 (inmediatamente después de inocular con cada especie de bacteria), 24, 48, 96, 168 hr y una vez que los cultivos de microalgas alcanzaran la fase estacionaria. Se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de las especies de microalgas cuando son cultivadas en conjunto con *Vibrio* spp. ( $p < 0.05$ ). En todos los experimentos se detectaron diferencias altamente significativas en la concentración de bacterias tipo *Vibrio* respecto al tiempo, obteniendo las concentraciones más bajas o indetectables ( $< 0.01$  BTCBS/ml), cuando los cultivos de microalgas se encontraron en fase estacionaria. Los tiempos de inhibición requeridos por cada especie de bacteria fueron estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ), siendo *V. harveyi* la especie más resistente y *V. alginolyticus* la más susceptible a la inhibición. Los cultivos de microalgas soportaron altas densidades de bacterias heterotróficas, en el orden de  $10^6$  y  $10^7$  por ml, indicando un efecto inhibitorio selectivo sobre *Vibrio* spp.

Se concluye que las especies de microalgas seleccionadas poseen alta actividad antibacteriana sobre las especies de bacterias estudiadas, siendo *I. galbana* CCMP, *N. incerta*, *N. byskanterae* y la cepa 2B las especies más eficientes para inhibir el crecimiento de bacterias tipo *Vibrio*. Además, la adición de bacterias tipo

*Vibrio* a los cultivos de microalgas modifica su crecimiento, obteniendo respuestas diferentes en función de la especie de bacteria utilizada.

Se recomienda realizar la identificación y caracterización del compuesto con actividad antibacteriana para cada especie estudiada, así como otras investigaciones que permitan elucidar su mecanismo de acción y toxicidad.

**Palabras Clave:** Microalga, inhibición, *Vibrio*, bacteria, crecimiento, compuesto.

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Ceres Anabel Molina Cárdenas** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in Aquaculture. Ensenada, Baja California, México September 2011.

### **Inhibitory effect of different microalgae species on *Vibrio* spp.**

The inhibitory effect of seven microalgae species against pathogen bacterias *Vibrio alginolyticus*, *V. campbellii* and *V. harveyi* was evaluated. The microalgae species selected were *Isochrysis galbana* CCMP, *Navicula incerta*, *Nitzschia laevis*, *Navicula byskanterae*, the strain 2B, *Nitzschia frustulum* var. *perminuta* and the strain 5B. Each microalgae species was maintained in monospecific cultures (by triplicate) in “f” media at an initial density of  $1 \times 10^5$  cells/ml and then were inoculated with *Vibrio* like bacterium (VLB) with an initial a density of  $\geq 1 \times 10^2$  /ml. In the microalgae cultures daily counts growth rate were calculated. To evaluate the inhibitory capacity of microalgae bacteria in ZoBell media and *Vibrio* like bacterium in TCBS media at times T0+1 (immediately after the inoculation with every specie of bacteria) were counted at 24, 48, 96, 168 hr and in the microalgae cultures stationary phase. Significant differences in the growth rate of the microalgae co-cultured with *Vibrio* spp. ( $p < 0.05$ ) were detected. In all experiments, highly significant differences in the concentration of *Vibrio* like bacterium over time were found, and lower or undetectable ( $< 0.01$  VLB/ml) concentration were detected when microalgae culture were at the stationary growth phase. The inhibition times required by each one of bacteria species were statistically different ( $p < 0.05$ ), *V. harveyi* was the most resistant specie and *V. alginolyticus* the most susceptible to inhibition. The microalgae cultures supported high densities of heterotrophic bacteria, in order of  $10^6$  y  $10^7$  per ml and showed a selective inhibitory effect on *Vibrio* spp.

We conclude that the selected microalgae species have a high antibacterial activity against *Vibrio* spp., and the addition of *Vibrio* like bacterium to the microalgae cultures can modify its growth, obtaining different responses as a function of the selected bacteria species.

We recommend the identification and characterization of the compound with antibacterial activity, as further research must be realized to elucidate their action mechanism and toxicity.

**Keywords:** Microalgae, inhibition, *Vibrio*, bacteria, growth.

## Dedicatorias

A **Dios**, por permitirme llegar a este día y darle tantas bendiciones a mi vida..

A mis padres, **Jaime** y **Rosa Margarita**, porque por ustedes soy lo que soy y estoy donde estoy, por ser ese pilar incondicional en todo momento de mi vida, por todo su amor y por motivarme con su ejemplo a ser mejor..

A mi hermano, **Jaime de Jesús**, por darme muestra de que con trabajo todo se puede lograr, por motivarme con su forma de ser y decirme que nunca me de por vencida.. Por ser el mejor hermano que se pueda tener..

A mis abuelos, **Margarita** (+), **Esther** y **Agustín**, por sus consejos, cuidados y bendiciones.. Se que desde donde estén no me dejan sola..

A mi pirata, **Fernando**, por darme tu amor y caminar a mi lado todos estos años, por tu apoyo para realizar mis metas y por soportar vientos y mareas..

## Agradecimientos

Al CONACyT, por otorgarme la beca para realizar mis estudios, sin su apoyo esto no hubiera sido posible. Al apoyo económico para la realización de esta tesis a través del proyecto del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACyT proyecto 130074).

Al CICESE, por aceptarme y permitirme formar parte de sus estudiantes y por los apoyos otorgados durante mi estancia.

Muy especialmente a la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra por aceptar ser la directora de este trabajo y ser mi guía en esta etapa de mi desarrollo profesional. Muchas gracias por todos sus comentarios y compartir conmigo sus conocimientos, por su entrega y disposición para ayudarme en todo momento, por abrirme los ojos a un panorama tan amplio como el mundo de las microalgas, pero sobre todo por su gran calidad humana y enseñarme que el trabajo bien hecho es aquel que se hace con pasión. Mil gracias Pily!!!

Al Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida, por aceptar formar parte de mi comité de tesis y enriquecer mi trabajo con sus atinados comentarios y sugerencias. Gracias por enseñarme a trabajar con bacterias y por proporcionarme las especies que se utilizaron en este trabajo, por asignarme un espacio en su laboratorio y en su equipo de trabajo.

Al Dr. Manuel Alberto Segovia Quintero por sus consejos para defender mi tesis y por sus observaciones y comentarios para mejorar mi trabajo. Gracias por compartir conmigo sus conocimientos y por su disposición para ayudarme siempre que lo necesité.

Al Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez por todas sus observaciones, cuestionamientos, y correcciones. Todas ellas contribuyeron en mi aprendizaje y crecimiento tanto personal como profesional.

Al Biol. Norberto Flores por ayudarme con los pesos secos y por hacer los días más ligeros en el laboratorio con sus pláticas y bromas.

A los técnicos de abastecimiento de agua José Espinosa, Luis Murillo, Adrián Celaya y Norberto Flores.

A la M. en C. Guadalupe Vargas Cárdenas por enseñarme las técnicas para mantenimiento de las cepas y por facilitarme el material de laboratorio que en algún momento necesité.

A las secretarias Cecilia Loera Quiñones y Bibiana Medina y Adriana Aguiar, por su ayuda con asuntos administrativos, copias y equipos.

A los servicios sociales Angyell Maza Cervantes, Paul Vargas y Ricardo Hoffman por ayudarme con el trabajo de laboratorio y preparación de material.

Gracias a los primos y amigos, Pedro y Gaby, por abrirme las puertas de su casa cuando llegué a Ensenada, por estar siempre que los necesité y brindarme su amistad. Eso es algo que siempre les voy a agradecer..

A mis papás, a mi hermano, a mis abuelos, a mi tía Anita, mis primos Nana, Martha y Tico, y a mi sobrina Vannia por brindarme su cariño y recibirme con gusto siempre que los visité.. Gracias por darme ánimo para seguir en pie.

A mis compañeros de generación y amigos Claudia, Lilián, Jenniffer, Ananda, Flor, Soco, Estrella, Tere, Yosef, Marco, Gaby, Pedro, Fernando, Sergio, Tzitziki, Jairo, Abraham, Edgar, Martha, Ivette, Selene, Luis, Pao, Emmanuel, Isa, Ari, Daniel, Edith, Jimmy, Lila, por todos

los momentos compartidos en el salón de clases y en convivios que harán que esta etapa sea inolvidable.

A ustedes mis chavas (Jenny, Lilián y Clau) por ser unas grandes amigas y compañeras de laboratorio, por su ayuda en los días de mucho trabajo, por echar chisme rico y por todas las risas y lágrimas que me sacaron.. Gracias por hacerme parte de esos momentos importantes en sus vidas!! Las quiero un buen viejas feas!!!

A mis amigos y hermanos del Ballet Tecolli, gracias por sus ánimos y muestras de afecto, por continuar alimentando ese sueño que empezamos juntos..

A ti Pirata Barreto por compartir tantos momentos buenos, por estar a mi lado en los ratos que no lo fueron tanto y por encontrar en ti la fuerza y las palabras necesarias para seguir... Gracias por hacerme tan feliz!!

Gracias a la familia Barreto Curiel por siempre recibirme con una sonrisa y tratarme en todo momento con amabilidad y cariño..

A ti que estás leyendo estos agradecimientos y no te encuentras en la lista.. Muchas gracias!! (Sorry, sabes que la memoria me suele fallar de vez en cuando 😊)

## CONTENIDO

<b>Resumen en español</b> .....	i
<b>Resumen en inglés</b> .....	iii
<b>Dedicatorias</b> .....	iv
<b>Agradecimientos</b> .....	v
<b>Contenido</b> .....	viii
<b>Lista de figuras</b> .....	x
<b>Lista de tablas</b> .....	xiii
<b>Capítulo I. Introducción</b> .....	1
<b>Capítulo II. Antecedentes</b> .....	7
<b>Capítulo III. Objetivos</b> .....	12
III.1 Objetivo general.....	12
III.2 Objetivos específicos .....	12
<b>Capítulo IV. Metodología</b> .....	13
IV.1 Características las cepas de diatomeas e <i>Isochrysis galbana</i> .....	13
IV.2 Cultivo de <i>Isochrysis galbana</i> y selección de especies de diatomeas ...	14
IV.2.1 Mantenimiento de cultivos .....	14
IV.2.2 Evaluación del crecimiento .....	14
IV.3 Cultivo de <i>Vibrio</i> .....	15
IV.4 Preparación de inóculo de bacterias.....	16
IV.5 Ensayos directos de inhibición del crecimiento de <i>Vibrio</i> .....	16
IV.6 Conteos de bacterias.....	17
IV.7 Manejo de residuos de cultivos y material infectado y medidas de bioseguridad .....	18
IV.8 Análisis estadístico .....	19
<b>Capítulo V. Resultados</b> .....	20
V.1 Crecimiento de diferentes cepas de <i>Isochrysis galbana</i> .....	20
V.2 Ensayos de Inhibición de <i>Vibrio</i> spp. con <i>Isochrysis galbana</i> .....	22
V.2.1 Crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> en cultivo microalga-bacteria .....	22
V.2.2 Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio</i> spp. en cultivos de <i>Isochrysis galbana</i> CCMP.....	23
V.3. Selección de especies de diatomeas cultivadas en medio “E” a dos temperaturas.....	28
V.4. Ensayos de inhibición del crecimiento de <i>Vibrio</i> spp. con diatomeas bentónicas.....	29
V.4.1 Crecimiento de las especies de diatomeas bentónicas seleccionadas.	29

**CONTENIDO (Continuación)**

V.4.2 Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio</i> spp. en cultivos de <i>Navicula incerta</i> .....	31
V.4.3 Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio</i> spp. en cultivos de <i>Nitzchia laevis</i> cepa C.....	34
V.4.3 Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio</i> spp. en cultivos de <i>Navicula byskanterrae</i> .....	37
V.4.4 Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio</i> spp. en cultivos de la cepa 2B.....	40
V.4.5 Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio</i> spp. en cultivos de <i>N. frustulum</i> var. <i>perminuta</i> .....	43
V.4.6 Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio</i> spp. en cultivos de la cepa 5B.....	46
<b>Capítulo VI. Discusión .....</b>	<b>52</b>
<b>Capítulo VII. Conclusiones .....</b>	<b>61</b>
<b>Capítulo VIII. Recomendaciones.....</b>	<b>63</b>
<b>Capítulo IX. Literatura citada.....</b>	<b>64</b>
<b>Capítulo X. Anexos .....</b>	<b>75</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Valores promedio y desviación estándar de la densidad de células de tres cepas de <i>I. galbana</i> mantenidas en cultivos estáticos: <i>I. galbana</i> CICESE (▲), <i>I. galbana</i> CCMP (■) y de <i>I. galbana</i> UTEX (●).	20
2	Valores promedio y desviación estándar de la densidad de células de <i>I. galbana</i> CCMP en combinación con <i>V. alginolyticus</i> (●), <i>V. campbellii</i> (▲) y <i>V. harveyi</i> (■) mantenidos en cultivos estáticos.	22
3	Valores promedio y desviación estándar de la densidad de <b>a</b> : <i>V. alginolyticus</i> ; <b>b</b> : <i>V. campbellii</i> y <b>c</b> : <i>V. harveyi</i> (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■) cultivadas en conjunto con <i>I. galbana</i> CCMP (●).	26
4	Valores promedio y desviación estándar de la densidad de <b>a</b> : <i>V. alginolyticus</i> ; <b>b</b> : <i>V. campbellii</i> y <b>c</b> : <i>V. harveyi</i> (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■) cultivadas en conjunto con <i>I. galbana</i> CCMP (●) en filtrados de 10 ml.	27
5	Valores promedio y desviación estándar de la densidad de células de las seis especies de diatomeas bentónicas seleccionadas y mantenidas en cultivos estáticos. <i>N. incerta</i> (●), <i>N. laevis</i> (○), <i>N. byskanterae</i> (▼), Cepa 2B (Δ), <i>N. frustulum</i> var. <i>perminuta</i> (■) y Cepa 5B (□).	29
6	Valores promedio y desviación estándar de la densidad de <b>a</b> : <i>V. alginolyticus</i> ; <b>b</b> : <i>V. campbellii</i> y <b>c</b> : <i>V. harveyi</i> (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■) cultivadas en conjunto con <i>N. incerta</i> (●).	33
7	Valores promedio y desviación estándar de la densidad de <b>a</b> : <i>V. alginolyticus</i> ; <b>b</b> : <i>V. campbellii</i> y <b>c</b> : <i>V. harveyi</i> (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■) cultivadas en conjunto con <i>N. laevis</i> cepa C (●).	36
8	Valores promedio y desviación estándar de la densidad de	39

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

	<b>a:</b> <i>V. alginolyticus</i> ; <b>b:</b> <i>V. campbellii</i> y <b>c:</b> <i>V. harveyi</i> (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ ) cultivadas en conjunto con <i>N. byskanterae</i> (●).	
9	Valores promedio y desviación estándar de la densidad de <b>a:</b> <i>V. alginolyticus</i> ; <b>b:</b> <i>V. campbellii</i> y <b>c:</b> <i>V. harveyi</i> (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ ) cultivadas en conjunto con la cepa 2B (●).	42
10	Valores promedio y desviación estándar de la densidad de <b>a:</b> <i>V. alginolyticus</i> ; <b>b:</b> <i>V. campbellii</i> y <b>c:</b> <i>V. harveyi</i> (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ ) cultivadas en conjunto con <i>N. frustulum</i> var. <i>perminuta</i> (●).	45
11	Valores promedio y desviación estándar de la densidad de <b>a:</b> <i>V. alginolyticus</i> ; <b>b:</b> <i>V. campbellii</i> y <b>c:</b> <i>V. harveyi</i> (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ ) cultivadas en conjunto con la cepa 5B (●).	48
12	Valores promedio y desviación estándar del tiempo de inhibición de cada cepa de bacteria.	50
13	Valores promedio y desviación estándar de la densidad de <b>a:</b> <i>V. alginolyticus</i> ; <b>b:</b> <i>V. campbellii</i> y <b>c:</b> <i>V. harveyi</i> (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ ) cultivadas en conjunto con <i>N. incerta</i> (●). Filtrado de 10 ml.	76
14	Valores promedio y desviación estándar de la densidad de <b>a:</b> <i>V. alginolyticus</i> ; <b>b:</b> <i>V. campbellii</i> y <b>c:</b> <i>V. harveyi</i> (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ ) cultivadas en conjunto con <i>N. laevis</i> cepa C (●). Filtrado de 10 ml.	77
15	Valores promedio y desviación estándar de la densidad de <b>a:</b> <i>V. alginolyticus</i> ; <b>b:</b> <i>V. campbellii</i> y <b>c:</b> <i>V. harveyi</i> (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ )	78

**LISTA DE FIGURAS (Continuación)**

- cultivadas en conjunto con *N. byskanterae* (●). Filtrado de 10 ml.
- |    |  |    |
|----|--|----|
| 16 | Valores promedio y desviación estándar de la densidad de <b>a</b> : <i>V. alginolyticus</i> ; <b>b</b> : <i>V. campbellii</i> y <b>c</b> : <i>V. harveyi</i> (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ ) cultivadas en conjunto con la cepa 2B(●). Filtrado de 10 ml.                                  | 79 |
| 17 | Valores promedio y desviación estándar de la densidad de <b>a</b> : <i>V. alginolyticus</i> ; <b>b</b> : <i>V. campbellii</i> y <b>c</b> : <i>V. harveyi</i> (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ ) cultivadas en conjunto con <i>N. frustulum</i> var. <i>perminuta</i> (● ). Filtrado de 10 ml. | 80 |
| 18 | Valores promedio y desviación estándar de la densidad de <b>a</b> : <i>V. alginolyticus</i> ; <b>b</b> : <i>V. campbellii</i> y <b>c</b> : <i>V. harveyi</i> (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ ) cultivadas en conjunto con la cepa 5B (●). Filtrado de 10 ml.                                 | 81 |

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular máxima (DCM) (10 <sup>6</sup> ), tasa de crecimiento ( $\mu$ ) para tres cepas de <i>I. galbana</i> . Letras iguales indican falta de diferencia significativa (ANOVA de una vía $\alpha = 0.05$ : a>b y probabilidad: <i>p</i> ).	21
II	Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) de diferentes especies de diatomeas bentónicas cultivadas a dos temperaturas de cultivo en medio "E". Letras iguales indican falta de diferencia significativa ( <i>t</i> -Student $\alpha = 0.05$ : a >b y probabilidad: <i>p</i> ).	28
III	Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular máxima (DCM) (10 <sup>6</sup> ) y de la tasa de crecimiento de <i>I. galbana</i> y seis especies de diatomeas bentónicas cultivadas sin cepas de bacterias. Letras iguales indican falta de diferencia significativa (ANOVA de una vía $\alpha = 0.05$ : a >b y probabilidad: <i>p</i> ).	30
IV	Valores promedio y desviación estándar de las tasas de crecimiento ( $\mu$ ), densidad celular máxima (células/ ml) alcanzadas en cultivos de microalgas sin/ en conjunto con diferentes cepas de bacterias <i>Vibrio</i> . Letras iguales indican falta de diferencia significativa (ANOVA de una vía $\alpha = 0.05$ : a >b>c y probabilidad: <i>p</i> ).	49
V	Valores promedio y desviación estándar de la densidad de bacterias que crecen en medio TCBS (BTCBS) al inicio ( <i>I</i> ), tiempo en días ( <i>T</i> ), tiempo en días para alcanzar el 90% de inhibición de la bacteria ( <i>I</i> <sub>90</sub> ) y valor de probabilidad ( <i>p</i> ) para las pruebas <i>t</i> -Student ( $\alpha = 0.05$ ) para <i>I. galbana</i> CCMP, <i>N. incerta</i> , <i>N. laevis</i> cepa C, <i>N. byskanterae</i> , la cepa 2B, <i>N. frustulum</i> var. <i>perminuta</i> y la cepa 5B cultivadas en conjunto con <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. campbellii</i> y <i>V. harveyi</i> .	51

## Capítulo I

---

### Introducción

---

A partir de los años 90 la camaronicultura en México ha presentado un crecimiento acelerado y la tendencia de producción se ha perfilado hacia el uso de sistemas de cultivo intensivos. En estos sistemas, las condiciones de temperatura, oxígeno disuelto, pH y la cantidad de materia orgánica proveniente del alimento no consumido y heces, están sujetas a fluctuaciones que deterioran la calidad del agua y conducen a desequilibrios en las comunidades bacterianas, mismas que pueden llegar a ser patógenas para el camarón (Gómez-Gil *et al.*, 2000).

Entre las principales enfermedades que afectan al camarón en condiciones de cultivos se encuentran aquellas ocasionadas por bacterias *Vibrio*. Estas bacterias pertenecen a la clase de las *Gammaproteobacterias*, las cuales son organismos cosmopolitas, con forma de bacilo, Gram-negativas, usualmente móviles, de 1.4 a 2.6 micras de longitud, anaerobios facultativos, oxidasa positivos, capaces de crecer en medio marino y en el medio selectivo Tiosulfato-Citrato-Sales de Bilis-Sucrosa (TCBS) y generalmente requieren sal (NaCl) para su crecimiento (Bradford *et al.*, 1994; Soto-Rodríguez, 2002; Thompson *et al.*, 2004). Es común encontrarlas en ambientes marinos y forman parte de la flora bacteriana natural de camarones silvestres y cultivados, pero pueden convertirse en patógenos oportunistas si las condiciones ambientales disparan la multiplicación de las bacterias que son toleradas en bajos niveles y cuando los sistemas de defensa natural del huésped se encuentran suprimidos (Venkateswara, 2009). No obstante, su espectro de acción no sólo se limita a los cultivos de camarón, también son patógenas para otros organismos acuáticos, como peces, moluscos e

inclusive corales y humanos (Álvarez *et al.*, 1998; Lizárraga-Partida *et al.*, 1998; Soto-Rodríguez *et al.*, 2003 y Gómez-Gil *et al.*, 2004).

El número de especies de *Vibrio* registradas se ha incrementado en la última década, llegando a contarse 63 miembros (Noriega-Orozco *et al.*, 2007). Entre las especies patógenas para organismos marinos con importancia en la acuicultura se encuentran *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, *V. alginolyticus* entre otras, mismas que pueden crecer rápidamente y tienen la capacidad de adaptarse a bajas concentraciones de oxígeno (Maeda, 1997). En este sentido, se ha publicado que la vibriosis es causa de pérdidas económicas importantes en la producción de *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris* en países como Filipinas, Indonesia, India, Tailandia, Ecuador, Venezuela, Australia y México (Álvarez *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 1998; Soto-Rodríguez, 2002 y Jayasree *et al.*, 2006).

La severidad de la vibriosis depende de las cepas de *Vibrio* involucradas, las condiciones ambientales y el estadio de desarrollo del organismo. En peces se distingue por distensión abdominal, melanosis y nado errático, en camarones se disminuye el tiempo de coagulación, hay anorexia, nado errático y abundantes vibrios en tejidos y hemolinfa, provocando mortalidades que en ocasiones alcanzan hasta el 100% (Trujillo *et al.*, 2005; Venkateswara, 2009).

Además de las fluctuaciones en la calidad del agua, otra aporte de contaminación por bacterias *Vibrio* en los cultivos es a través del suministro del alimento vivo, particularmente por el uso de nauplios de *Artemia* durante los primeros estadios larvales de crustáceos y peces (Villamil *et al.*, 2003). La *Artemia* es un crustáceo de fácil cultivo, con un ciclo de vida corto, alto valor nutricional, distribución cosmopolita, gran adaptabilidad a salinidades altas y a diversas condiciones de cultivo (Jiménez *et al.*, 2006), sin embargo se han llegado a contar hasta  $6 \times 10^7$  BTCBS/ml (Bacterias que crecen en medio Tiosulfato Citrato Bilis Sucrosa) en los

sitios de producción, recolección y comercialización de este crustáceo (Negrete-Redondo *et al.*, 2008).

Para disminuir la carga bacteriana en este crustáceo se han implementado métodos que incluyen el uso de bacterias probióticas como *Lactobacilos brevis* en una densidad de  $1 \times 10^8$  bacterias/ml, 0.1 g/l de ácido láctico y proporcionarles como alimento especies de microalgas que han demostrado producir sustancias antimicrobianas, tal es el caso de *Tetraselmis sp.* e *Isochrysis galbana* (Salvesen *et al.*, 2000).

Los métodos que se emplean para controlar a estas bacterias en los sistemas de producción acuícola incluyen el uso de antibióticos y alimentos medicados, los cuales se utilizan erróneamente como medida profiláctica y en la mayoría de los casos se aplican de manera excesiva, obteniendo frecuentemente resultados poco efectivos y promoviendo el surgimiento de cepas resistentes a los antibióticos, lo cual se ha convertido en un problema global (Moriarty, 1999; Nakai y Park, 2002; Vinod *et al.*, 2006, Defoirdt *et al.*, 2007; Karunasagar *et al.*, 2007). Además del desarrollo de cepas bacterianas con resistencia a los antibióticos, se han reportado brotes de otras especies oportunistas que también pueden ser patógenas, las cuales una vez que han pasado el efecto del químico utilizado como antibiótico, encuentran las condiciones idóneas para su proliferación (Maeda *et al.*, 1997). Se ha descrito que es posible que el uso de antibióticos en grandes cantidades puede derivar en un incremento de la virulencia de los microorganismos y además promover la transferencia de resistencia a antibióticos en patógenos humanos (Moriarty, 1999; Center for Disease Control Rebuttal, 1999).

Hasta el momento, no se han desarrollado nuevas alternativas de antibióticos que además de controlar el problema de proliferación de patógenos de forma eficiente éstas sean compatibles con el medio ambiente. Algunas estrategias que se han

probado en años recientes para combatir infecciones en la acuicultura son la inhibición de la detección del quórum (también conocido como “quórum sensing”) de las bacterias, la terapia con bacteriófagos, y medidas antagonistas como el uso de probióticos y aguas verdes. La detección del quórum es un mecanismo en el cual las bacterias coordinan la expresión de ciertos genes en respuesta a su densidad de población mediante la producción, liberación y detección de pequeñas moléculas señal (Defoirdt *et al.*, 2004; Defoirdt *et al.*, 2006). En las bacterias Gram-negativas, como las bacterias del género *Vibrio*, estas moléculas señal son las homoserinas lactonas aciladas (AHLs) (Suga y Smith, 2003; Defoirdt *et al.*, 2004; Bruhn *et al.*, 2005). Mediante la inhibición de estas moléculas señal se regula la expresión de luminiscencia o factores de virulencia requeridos para desarrollar la patogenicidad (Suga y Smith, 2003). Esta técnica no ejerce una presión selectiva por lo que representa una opción con bajo riesgo de desarrollo de resistencia, sin embargo aun no se desarrolla la tecnología para aplicaciones prácticas (Defoirdt *et al.*, 2007). A principios de los años 20 se descubrieron a los bacteriófagos como infecciones virales de bacterias y su valor como antibacterianos y medida profiláctica en la acuicultura ha sido reconocida hasta hace pocos años (Defoirdt *et al.*, 2007). Esta terapia ofrece algunas ventajas como poca o nula afectación a la flora intestinal de los organismos de cultivo debido a que el rango de hospederos de los bacteriófagos es muy estrecho y una alta especificidad en combatir a los organismos patógenos (Nakai y Park, 2002; Defoirdt *et al.*, 2007).

A pesar de que las estrategias antes descritas representan una opción con mucho potencial para el control de enfermedades causadas por bacterias, ninguna ofrece una opción que mitigue los daños por sí sola. En este sentido, es necesario que los métodos nuevos se enfoquen en utilizar la capacidad antagónica de ciertos organismos para reprimir a otros organismos patógenos, basados en la producción de metabolitos secundarios como agentes antimicrobianos o el desplazamiento

de las especies patógenas a través de la competencia por el nicho o alimento, englobando un concepto conocido como control biológico o biocontrol.

El descubrimiento de nuevas moléculas terapéuticas se vuelve más importante conforme avanza la resistencia de las bacterias a los antibióticos usuales y desde la segunda mitad del siglo XX, las diatomeas han sido utilizadas como aporte de compuestos con actividad biológica en países asiáticos (Naviner *et al.*, 1999).

Investigaciones realizadas por Bruce y Duff (1967) Nagayama *et al.* (2002) Shimizu (2003) Avedaño-Herrera *et al.* (2005) y recientemente Paul *et al.* (2007), afirman que tanto macro como microalgas, son productoras de metabolitos secundarios que exhiben un arreglo diverso de actividad bactericida, tales como ácidos grasos, polisacáridos, glicolípidos, terpenoides y péptidos. Esta característica, aunada a la amplia diversidad de especies, convierten a las diatomeas en una alternativa potencial de nuevos antibióticos naturales y por lo tanto, de agentes de biocontrol (Defoirdt *et al.*, 2007).

La actividad antagónica de las diatomeas sobre comunidades bacterianas también ha sido descrita. La presencia de estas microalgas afecta la composición de las comunidades bacterianas principalmente por medio de la producción de sustancias antibacterianas que son liberadas de manera extracelular, acción conocida como alelopatía. La alelopatía es un mecanismo mediante el cual el crecimiento de microorganismos se puede ver afectado de manera positiva o negativa debido a la producción de sustancias exocrinas por parte de un microorganismo en particular. A su vez el efecto de estas sustancias puede variar dependiendo de la condición fisiológica de las células o a la fase de crecimiento en que se encuentre el cultivo (Maestrini y Bonin, 1981). Entre las especies que han resultado exitosas para el control de bacterias en cultivos se encuentran *Chaetoceros* sp., *Skeletonema costatum* y *Tetraselmis* sp., las cuales han sido

extensamente descritas como microalgas con capacidad inhibitoria de bacterias (Riquelme y Avedaño-Herrera, 2003; Tendencia y de la Peña, 2003).

Taxonómicamente, esta actividad antimicrobiana se ha evaluado de manera predominante en especies pertenecientes a las Crysofitas, entre las cuales destacan los géneros de *Chaetoceros*, *Nitzschia* y *Thalassiosira* (Pesando, 1990). Sin embargo, debido a que el efecto antibiótico de una especie en particular no es el mismo en todas las especies de bacterias patógenas, y aunado al reciente interés y poco conocimiento en esta área, es necesario hacer investigaciones que ayuden a identificar más especies y compuestos que podrían brindar una solución a las bacteriosis causadas por *Vibrio* spp. en organismos de interés en la acuicultura.

El descubrimiento de especies con potencial producción de compuestos que ayuden en el biocontrol de enfermedades, contribuirá a desarrollar una acuicultura menos dañina para el ambiente al disminuir el uso de químicos, reducción de los costos económicos de la producción y aumento en la rentabilidad de la industria acuícola. Bajo este esquema *I. galbana* y las diatomeas aisladas de los estados de Baja California y Nayarit serían productoras potenciales de compuestos con actividad antimicrobiana, capaces de inhibir el crecimiento de cepas patógenas de *Vibrio*.

## Capítulo II

---

### Antecedentes

---

Una gran variedad de compuestos con estructuras química única han sido descubiertos principalmente en invertebrados marinos y entre los principales productores de metabolitos secundarios se encuentran las microalgas, los hongos y bacterias (Shimizu, 1993).

Hasta donde se conoce, los primeros estudios acerca de compuestos con actividad antimicrobiana en microalgas fueron descritos por Shirahama (1942), quien investigó que *Cystophyllum hakodatense* tenía efecto sobre *Lactobacillus bulgaris* y *Lactobacillus helveticus*. Estudios posteriores como el realizado por Pratt (1951), encontraron que algunos extractos de algas marinas solubles en éter inhibían el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. De manera similar Bruce y Duff (1967), encontraron actividad antibacteriana en dos extractos solubles en acetona de *I. galbana*. La identificación de estos compuestos reveló que probablemente se trataba de feofitina a y una clorofilida a atípica.

Kellam y Walker (1989), evaluaron la actividad antimicrobiana de 132 especies de microalgas marinas cultivadas en laboratorio contra 6 especies de bacterias y mencionan que los extractos con solventes orgánicos fueron los que presentaron mejor actividad. Las especies que presentaron mayor susceptibilidad a los extractos fueron *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

Hay estudios que señalan que la actividad biológica de diferentes especies de microalgas sobre bacterias patógenas se ve afectada por la temperatura de la zona de donde provienen las especies de microalgas. En este sentido, De Lara-

Isassi (1991), estudió las propiedades antibióticas de 28 especies de microalgas marinas bentónicas recolectadas en distintas zonas. De acuerdo a la ocurrencia de especies de microalgas y a sus características antimicrobianas definió tres zonas: templada a la zona de California, subtropical la región de Sonora y como tropical a Sinaloa. El 62% de las especies analizadas presentaron alguna actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Micrococcus lysodeikticus*, correspondiendo con mayor porcentaje a las microalgas de zonas templadas.

La actividad antibacteriana de la diatomea *Skeletonema costatum* contra patógenos de organismos en cultivo fue examinada por Naviner (1999). Sus resultados afirman que el crecimiento de *Listonella* (= *Vibrio*) *anguillarum* y algunas especies del género *Vibrio* fueron inhibidas en el agua de cultivo, lo cual revela el potencial de la diatomea en el control de enfermedades, en particular de la vibriosis y recomienda que se realicen estudios posteriores en vivo para determinar si la acción antibacteriana es debido a un producto extracelular.

Nagayama *et al.* (2002), utilizaron compuestos como las florotaninas, derivados de la macroalga café *Ecklonia kurome* en ensayos contra *V. parahaemolyticus*. Encontraron una alta actividad antimicrobiana contra esta especie de bacteria, al matarla en su totalidad a en un periodo de 0.5 a 2 horas. Tal efecto se logró tras aplicar el doble de la concentración mínima bactericida (CMB) de florotaninas purificadas o crudas como eckol, florofucofuroeckol A y diecol. Otras sustancias como las lectinas extraídas de *Eucheuma serra* y *Galaxaura marginata* también han sido utilizadas con éxito en el control de *Vibrio vulnificus* y *Vibrio pelagius* por Liao *et al.* (2003). En este mismo estudio se encontró que los metabolitos producidos por *Pterocladia capillacea* y *E. serra* encontrados en los extractos salinos y acuosos inhiben la tasa de crecimiento de *V. vulnificus* y *V. pelagius*, sin tener efecto sobre *V. neresis*. Agregan que la actividad antibacteriana de *P. capillaces* se incrementa cuando es cultivada bajo condiciones de alta irradiancia, estrés severo producido por nutrientes y temperatura de 20 °C.

Especies como *Chlorella* y *Tetraselmis suecica* también han demostrado actividad antibacteriana sobre especies de *Vibrio*. Lo anterior es respaldado por Tendencia y de la Peña (2003) quienes afirman que *Chlorella* posee actividad antibacteriana sobre *Vibrio harveyi*, mientras que *Tetraselmis suecica* y *Tetraselmis* sp. Presentan actividad antimicrobiana contra *Listonella anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio* sp. (Viso *et al.*, 1987; Kellam y Walter, 1989; Austin y Day, 1990; Olsen *et al.*, 2000).

En los últimos años, se ha investigado la capacidad antagónica de las microalgas a través del uso de los cultivos en aguas “verdes”. Esta técnica consiste en la adición de microalgas en los sistemas de agua cerrados en los estadios más críticos, esto es, cuando las larvas son frágiles, sensibles a cambios en el ambiente y pueden estresarse fácilmente (Marques *et al.*, 2006). En el sistema de aguas verdes se ha experimentado con especies como *I. galbana*, *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros calcitrans*, *Nitzschia* sp., *Skeletonema costatum* y *Chlorella* sp. Los beneficios de utilizar esta técnica repercuten en la calidad del agua, al encontrar concentraciones muy bajas o indetectables de bacterias tipo *Vibrio* (Lio-Po *et al.*, 2005; Marques *et al.*, 2006), mejoran la supervivencia de las larvas debido a la estimulación de sus capacidades digestivas o a la influencia en la población bacteriana del agua de cultivo, contribuyendo al establecimiento de una flora intestinal temprana en las larvas (Marques *et al.*, 2006; Tinh *et al.*, 2008). Así mismo se ha visto que el agua proveniente de cultivos de *Peneus monodon* y *Oreochromis mossambicus* es una fuente potencial de diferentes agentes anti *Vibrio*. En estos estudios se afirma que las bacterias aisladas del mucus y del intestino de la tilapia son agentes capaces de prevenir brotes de vibriosis en cultivo de juveniles de *P. monodon* (Lio-Po *et al.*, 2005). Se menciona que el agua verde proveniente de los tanques de reproductores de *O. mossambicus*, tiene la capacidad de inhibir a los *Vibrios* luminiscentes durante más de una semana y que el agua residual de los

estanques de mantenimiento de los reproductores son un mejor aporte de agua verde que los juveniles de esta especie (Huervana *et al.*, 2006).

Un estudio más reciente realizado por Desbois *et al.*, (2009) demostró que el producto de la lisis de diatomeas marinas como *Phaeodactylum tricornutum* despliegan actividad antibacteriana sobre una cepa multiresistente a antibióticos de *Staphylococcus aureus*. Los resultados de los análisis de espectrometría de masas y espectroscopia de resonancia magnética nuclear de hidrógeno de estos lisados revelaron que la actividad antibacteriana provenía de un ácido graso poli-insaturado, el ácido eicosapentanoico (EPA). Resultados similares también han sido descritos por Sánchez-Saavedra *et al.* (2010), quienes evaluaron la actividad biológica de extractos orgánicos de especies de microalgas como *Synechococcus elongatus*, *Synechocystis* sp., *Amphiprora paludosa*, *Porphyridium cruentum*, *Chaetoceros muelleri*. Los resultados indican que estas especies de microalgas pueden ser utilizadas para inhibir el crecimiento de bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus*. Por lo que los efectos de los compuestos producidos por los cultivos indican un efecto especie-específico. Además, sugieren que se realicen estudios posteriores para identificar los compuestos que presentaron actividad antibacteriana.

La actividad biológica de las microalgas también ejerce presión sobre otras especies de bacterias patógenas para organismos de importancia acuícola, como la causante de la hepatopancreatitis necrotizante (NHPB). Estudios como el realizado por Avila-Villa *et al.* (2011) revelan que *Chaetoceros muelleri* y *Dunaliella* sp. no son vectores de propagación esta bacteria, al no encontrarla a través de detección por el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) en cultivos que previamente fueron inoculados a propósito con la bacteria. Los autores atribuyeron estos resultados a la capacidad de producir

sustancias antibióticas y por lo tanto es probable que la NHPB fuera afectada por dichas sustancias.

Dada la amplia variedad de especies y compuestos con actividad biológica de los que pueden ser fuente, las microalgas ofrecen una alternativa prometedora al uso de antibióticos.

## Capítulo III

---

### Objetivos

---

#### III.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad inhibitoria de diferentes especies de microalgas contra bacterias pertenecientes al género *Vibrio* patógenas para organismos de importancia acuícola.

#### III.2 Objetivos específicos

- Seleccionar una cepa de *Isochrysis galbana* y especies de diatomeas bentónicas en base a su mayor tasa de crecimiento, para realizar ensayos de inhibición de bacterias patógenas cultivadas en conjunto con las especies de microalgas seleccionadas.
- Evaluar el efecto inhibitorio de las especies seleccionadas de microalgas contra *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi*, y *V. campbellii*.

## Capítulo IV

---

### Metodología

---

#### IV.1 Características las cepas de diatomeas e *Isochrysis galbana*

Los cultivos de diatomeas se obtuvieron a partir de cepas aisladas de las costas de Baja California (BC) (10) y de Nayarit (5), México. Las cepas de Baja California corresponden a: *Nitzschia thermalis* var. *minor*, tres diferentes cepas de *Nitzschia laevis* (cepa A, B y C), *Nitzschia cf. fonticola* var. *pelagica*, *Amphiprora paludosa* var. *hyalina*, *Nitzschia frustulum* var. *perminuta* aisladas del Ejido Eréndira, B.C. por Correa-Reyes (2001). Las cepas de *Nitzschia* sp. y *Nitzschia laevis* (cepa 4) fueron aisladas como epífitas de *Macrocystis pyrifer*a de la Bahía de Todos Santos (BTS), B.C. por Sánchez-Saavedra (comp. pers.) y *Navicula incerta* fue aislada de la BTS por personal del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), de la Universidad Autónoma de Baja California.

Las cepas de Nayarit corresponden a: *Amphora tenerrima* Hustedt, *Navicula byskanterae*, cepa 2B, cepa RB, y la cepa 5B aisladas por Aguilar-May (2002). Todas las cepas antes mencionadas fueron obtenidas de la colección particular de la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra, investigadora del Laboratorio de Microalgas del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

La cepas de *Isochrysis aff. galbana* Parke con clave CCMP1323 (CCMP) se obtuvo del “Provasoli-Guillar National Center for the Culture of Marine Phytoplankton” del “Bigelow Laboratory for Ocean Sciences”, ubicado en West

Boothbay Harbor, Maine, E.U.A. La cepa de *I. galbana* (CICESE) fue obtenida de aislamiento de muestras de agua de BTS y se mantiene en la colección personal de la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra y la cepa de *I. galbana* clave LB 2307 fue obtenida de la Colección de Cultivo de Algas de la Universidad de Texas, Austin E.U.A. (UTEX).

## **IV.2 Cultivo de *Isochrysis galbana* y selección de especies de diatomeas**

### **IV.2.1 Mantenimiento de cultivos**

Las cepas de *I. galbana* y de las 15 especies de diatomeas bentónicas se mantuvieron de forma no axénica y monoespecífica en “batch” o cultivos estáticos sin recambio de medio. Para la preparación de los medios de cultivo se utilizó agua de mar proveniente del sistema semicerrado que abastece al laboratorio húmedo central del Departamento de Acuicultura del CICESE. El agua de mar tuvo un proceso de sedimentación y pasó por una serie de filtros rápidos de arena y de algodón de 10, 5 y 1  $\mu\text{m}$  y se irradió con luz ultravioleta. El agua de mar se esterilizó en una autoclave a 121  $^{\circ}\text{C}$  y a una presión de 1.02 kg/cm por un periodo de 20 minutos.

El cultivo de las distintas especies se realizó en matraces Erlenmeyer de 125 ml que contenían 100 ml de agua de mar estéril con medio “f” (Guillard y Ryther, 1962). Para cada especie se realizó mantenimiento semanal, mediante una nueva inoculación con un volumen apropiado de cultivo (10%) y se transfirió a medio nuevo como ya descrito. Los cultivos se mantuvieron a 28  $^{\circ}\text{C}$  y con irradiancia continua de luz blanca fría (SILVANIA F40W) y 110  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ .

### **IV.2.2 Evaluación del crecimiento**

Para evaluar el crecimiento de las distintas especies se realizaron cultivos monoespecíficos y por triplicado mantenidos en matraces Erlenmeyer de 500 ml para las cepas de *I. galbana* y en matraces de 250 ml para el caso de las

diatomeas. Todos los cultivos se realizaron con iluminación continua a una irradiancia de  $110 \mu \text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ .

El medio utilizado para el crecimiento de *I. galbana* fue medio “f” y los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 28 °C. En tanto que para el cultivo de las diatomeas se simularon condiciones de calidad de agua y de temperatura similares a una granja camaronícola, por lo que se utilizó el medio “E” descrito por Aguilar-May (2002), y se mantuvieron a 20 y 28 °C.

El crecimiento se evaluó por medio de conteos celulares a diarios con un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad y un microscopio compuesto. La tasa de crecimiento se evaluó con la ecuación descrita por Fogg y Thake (1978).

Con base a los valores de la tasa de crecimiento de las tres cepas de *I. galbana* y de las 15 especies de diatomeas, se seleccionaron para cada grupo las que tuvieron una mayor tasa de crecimiento. Estas especies seleccionadas fueron utilizadas posteriormente para realizar los ensayos de inhibición con las distintas cepas de *Vibrio*.

### **IV.3 Cultivo de *Vibrio***

Se utilizaron tres cepas patógenas para organismos acuáticos, la cepa de *Vibrio alginolyticus* proveniente de la “American Type Culture Collection” (ATCC) 17749, (CICESE 4), *V. harveyi* DN01 (CICESE 597) y *V. campbellii* proveniente de la “Collection of Aquacultural Importance Micro-organism” (CAIM) 416, (CICESE 559), la cual pertenece al Centro de Investigación y Desarrollo Alimentario (CIAD). Las especies mencionadas fueron obtenidas de la colección del CICESE, mismas que se encuentra bajo el resguardo del Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida, investigador del Departamento de Biotecnología Marina del CICESE.

Cada especie de bacteria se obtuvo a través del cultivo de una colonia pura mantenida en viales de vidrio que contenían 10 ml de medio ZoBell (DIFCO). Se tomó una colonia del vial y se resembró en cajas Petri que contenían 20 ml de medio ZoBell, y se incubaron durante 24 h a 26 °C.

#### **IV.4 Preparación de inóculo de bacterias**

Previo al inicio del experimento se prepararon tubos de cultivo que contenían 9 ml de suero fisiológico, que se elaboró disolviendo 9 g de NaCl en 1 litro de agua destilada. Una vez que la solución se colocó en los tubos de cultivo se esterilizaron por 20 min a 120 °C y a 1.05 kg/m<sup>2</sup> de presión. Posterior a la esterilización se dejaron enfriar y se reservaron para su uso posterior.

De uno de los tubos de cultivo que contenían suero fisiológico estéril se tomó dos mililitros y se vertieron sobre una caja Petri densamente sembrada con cada especie de bacteria. Al tiempo de vaciar el suero fisiológico se raspó con cuidado la capa de bacterias, evitando raspar la superficie del agar. Una vez que la mayor parte de bacterias fueron removidas de la superficie de la placa, se recolectó la mezcla de bacterias y se regresó al tubo de cultivo. La mezcla se agitó y se dejó reposar por 30 minutos para permitir que los agregados de bacterias se disolvieran. Posterior a los 30 minutos, se tomó otro tubo de cultivo con suero fisiológico estéril y se fueron adicionando gotas de la mezcla de bacterias preparada anteriormente hasta alcanzar una densidad óptica de 0.05 a 600 nm, lo cual equivale a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml (Anguiano-Beltrán, 1996).

#### **IV.5 Ensayos directos de inhibición del crecimiento de *Vibrio***

Las especies seleccionadas se cultivaron de manera monoespecífica, no axénica y por triplicado en matraces Erlenmeyer con 200 ml de medio "f". Previo a la

inoculación de cada matraz se realizó una filtración de 1 y 10 ml de cultivo de microalga para asegurar la ausencia de bacterias tipo *Vibrio* en estos. A cada matraz se le adicionó 1 ml del inóculo de bacterias preparado en la forma descrita anteriormente, con lo que al final se obtuvo una concentración aproximada a  $1 \times 10^2$  UFC/ml. El número de células de cada especie se calculó a partir de un cultivo madre para tener una concentración inicial de 100,000 células/ml en cada matraz. Los cultivos microalga-bacteria fueron iluminados con lámparas fluorescentes a una irradiancia continua de  $110 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  y con temperaturas de 21 a 24 °C en el caso de *I. galbana*, mientras que los cultivos diatomea-bacteria se mantuvieron a 28 °C bajo la misma irradiancia en el laboratorio de patógenos del Departamento de Biotecnología Marina del CICESE.

#### **IV.6 Conteos de bacterias**

Para conocer la cantidad de bacterias heterotróficas y Bacterias que crecen en medio Tiosulfato Citrato Bilis Sucrosa (BTCBS) (TCBS, DIFCO) presentes en los cultivos, se realizaron conteos indirectos en placas. Para corroborar que los cultivos de microalgas no contenían BTCBS y conocer la cantidad de bacterias heterotróficas presentes previo a la inoculación con la bacteria, se filtraron 1 y 10 ml de cada cultivo de microalga de manera individual. Los filtrados de 10 ml se realizaron con la finalidad de corroborar la ausencia de bacterias, aún concentrando un mayor volumen de cultivo. Para los filtrados con 10 ml no se realizaron análisis estadísticos. Para este fin se utilizaron filtros estériles de nitrocelulosa de 47 mm de diámetro y una luz de malla de  $0.22 \mu$ . Los filtros con la muestra se colocaron en cajas Petri de 6 cm de diámetro que contenían medio TCBS. Para evaluar el número de bacterias heterotróficas presentes en los cultivos de microalgas se realizaron diluciones  $10^{-3}$  y posteriormente se tomó 0.1 ml de esta dilución, mismo que se sembró en cajas Petri que contenían 20 ml de

medio ZoBell. Este procedimiento se repitió una vez que se adicionó el inóculo de bacterias y posteriormente a las 48, 96, 168 horas post-inoculación y una vez que el cultivo de microalga alcanzó la fase estacionaria. Las cajas con cultivo se incubaron a 28 °C durante 24 h y se realizó el conteo de las colonias que crecieron durante el periodo de incubación, las cuales se expresaron en unidades formadoras de colonia presentes en 1 ml (UFC/ml). Para estos conteos de bacterias heterotróficas no se realizaron análisis estadísticos, ya que se considero que el aumento en un orden de magnitud fue representativo de cambio en la concentración.

#### **IV.7 Manejo de residuos de cultivos y material infectado y medidas de bioseguridad**

Las cajas de Petri, pipetas y papel que estuvieron en contacto con las bacterias utilizadas en este estudio se almacenaron en bolsas especiales para autoclave y se esterilizaron durante 15 minutos antes de ser desechadas. Los matraces, tubos de cultivo y sistemas de filtración utilizados se esterilizaron una vez terminado el experimento o muestreo, se lavaron y antes de volver a utilizarlos se re esterilizaron.

Para mitigar el riesgo sanitario que implica el uso de bacterias marinas, todos los matraces con los cultivos microalga-bacteria y material que estuvo en contacto con las bacterias se mantuvo en el Laboratorio de Patógenos del Departamento de Biotecnología Marina del CICESE, en el área que se encuentra bajo el resguardo del Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida. Este laboratorio se encuentra aislado y cuenta con su propio sistema de almacenamiento de agua residual, la cual es tratada antes de ser arrojada al drenaje común, previniendo un problema de contaminación en otras áreas.

#### IV.8 Análisis estadístico

Para todos los análisis estadísticos se tomaron en consideración las hipótesis que fundamentan estas pruebas y que son la normalidad, la homogeneidad de varianzas y la independencia (Sokal y Rohlf, 1979; Zar, 1984). Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para saber si existieron diferencias significativas entre las tasas de crecimiento de las distintas especies de microalgas con las cepas de *Vibrio*.

Con la finalidad de conocer las posibles diferencias entre las tasas de crecimiento de las diatomeas mantenidas en las 2 diferentes temperaturas en medio "E" se utilizó una prueba *t*-Student para cada especie.

Para evaluar el efecto inhibitorio de las microalgas sobre el crecimiento de cada una de las especies de *Vibrio* se utilizó un ANOVA de una vía. De encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos se procedió a utilizar una prueba *a posteriori* Tukey, con la que se estableció las diferencias entre los tratamientos.

Además, se utilizaron pruebas *t*-Student para verificar el cambio de la concentración de bacterias con respecto al tiempo, tomando como referencias la concentración de bacterias tipo *Vibrio* al momento de la inoculación y al tiempo en el que se presentó el 90% de inhibición de la misma.

Se trabajó con el programa estadístico STATISTICA® versión 8.0 (Stat Soft Inc., 2002) y se consideró un valor de significancia de 0.05.

## Capítulo V

### Resultados

#### V.1 Crecimiento de diferentes cepas de *Isochrysis galbana*

El crecimiento de las tres cepas de *I. galbana* se siguió durante 10 días, tiempo en el que se encontró que la cepa con mejor crecimiento fue la cepa de *I. galbana* CCMP y fue la que alcanzó una densidad de  $2.2 \times 10^7$  células/ml. Las cepas de *I. galbana* CICESE y UTEX alcanzaron una densidad de células de  $2.2 \times 10^7$  y  $8.5 \times 10^6$  células/ml respectivamente. Cabe señalar que se encontraron diferencias altamente significativas en el crecimiento de las tres cepas de *I. galbana*, ( $p < 0.001$ ) (Tabla 1) y la decisión de seleccionar a *I. galbana* CCMP se debió a que esta cepa proviene de un banco de cepas de referencia y es muy utilizada en la acuicultura, no obstante que la cepa *I. galbana* CICESE alcanzó una densidad celular similar.

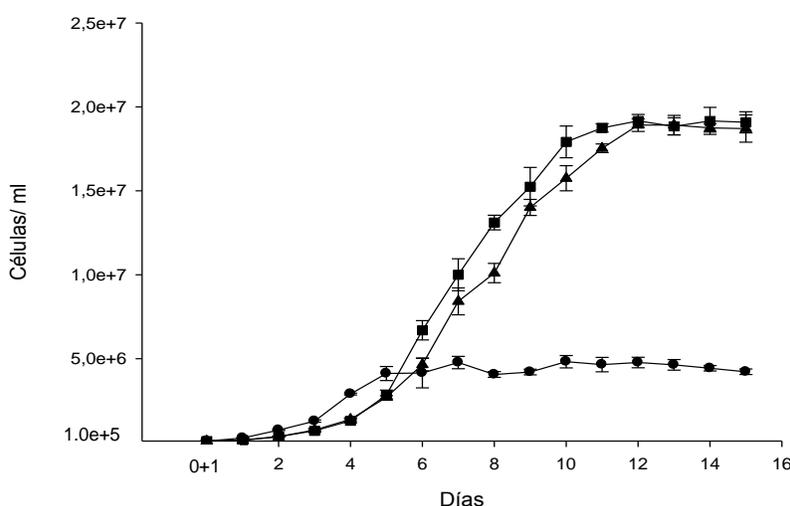


Figura 1.- Valores promedio y desviación estándar de la densidad de células de tres cepas de *I. galbana* mantenidas en cultivos estáticos: *I. galbana* CICESE (▲), *I. galbana* CCMP (■) y de *I. galbana* UTEX (●).

Tabla I.- Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular máxima (DCM) ( $10^6$ ), tasa de crecimiento ( $\mu$ ) para tres cepas de *I. galbana*. Letras iguales indican falta de diferencia significativa, ANOVA de una vía  $\alpha = 0.05$ : a>b.

Especie	DCM	$\mu$
<i>I. galbana</i> UTEX	4.7 $\pm$ 0.3 b	0.09 $\pm$ 0.02 b
<i>I. galbana</i> CICESE	18.7 $\pm$ 0.3 a	0.52 $\pm$ 0.01 a
<i>I. galbana</i> CCMP	19.2 $\pm$ 0.3 a	0.55 $\pm$ 0.01 a

## V.2 Ensayos de Inhibición de *Vibrio* spp. con *Isochrysis galbana*

### V.2.1 Crecimiento de *Isochrysis galbana* en cultivo microalga-bacteria

Los filtrados de 1 ml y 10 ml previos a la inoculación con cada tipo de bacteria resultaron libres de BTCBS, ya que no se presentó crecimiento de colonias en las cajas Petri con medio TCSBS. Los conteos de células de *I. galbana* se siguieron durante 16 días, tiempo que tomó para que el crecimiento celular llegara a su fase estacionara. La densidad de células de *I. galbana* en combinación con *V. alginolyticus* registró en esta fase un promedio  $3.2 \times 10^7$  células/ml, valores significativamente menores ( $p < 0.05$ ) (Tabla 4) a los que se presentaron en conjunto con *V. harveyi* y *V. campbellii* (Fig. 2), en los cuales, de manera similar, se obtuvieron  $3.6 \times 10^7$  células/ml en promedio.

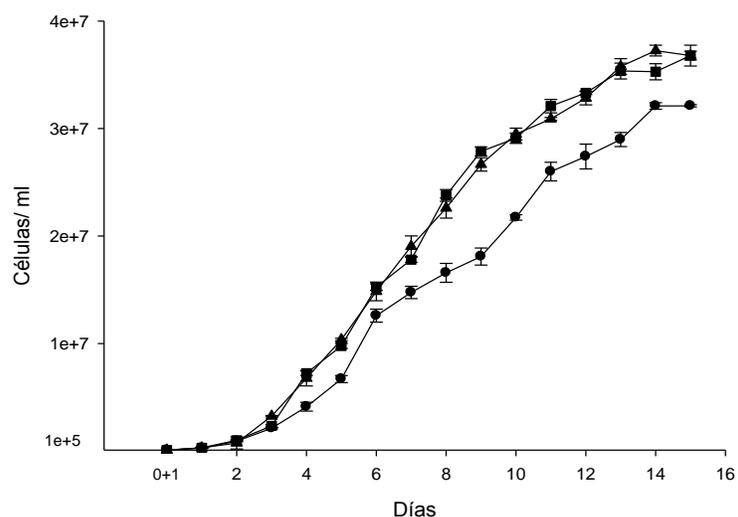


Figura 2.- Valores promedio y desviación estándar de la densidad de células de *I. galbana* CCMP en combinación con *V. alginolyticus* (●), *V. campbellii* (▲) y *V. harveyi* (■) mantenidos en cultivos estáticos.

### V.2.2 Inhibición del crecimiento de *Vibrio* spp. en cultivos de *Isochrysis galbana* CCMP

El efecto inhibitorio de *I. galbana* CCMP respecto al crecimiento de *V. alginolyticus* se presentó a partir del segundo día de cultivo (Fig. 3a), justo durante la fase exponencial de crecimiento de la microalga. Al inicio del experimento, se registraron concentraciones superiores a  $1 \times 10^2$  BTCBS/ml, mientras que al segundo día de muestreo (48 h post inoculación) el número de bacterias disminuyó considerablemente (61 BTCBS/ml en promedio). Se encontraron diferencias altamente significativas en las concentraciones al inicio y a las 48 h ( $p < 0.001$ ), tiempo en el que se alcanzó una inhibición superior al 90% (Tabla 5).

La inhibición total de *V. alginolyticus* se encontraron a partir de las 96 h y se conservó hasta que la microalga alcanzó la fase estacionaria, en la que se alcanzó una densidad de  $3.2 \times 10^7$  células/ml. El número de bacterias heterotróficas inició con  $2.3 \times 10^6$  UFC/ml y posteriormente se encontraron aproximadamente  $5.2 \times 10^6$  UFC/ml a partir de las 48 h. En los muestreos subsecuentes el número de bacterias heterotróficas fue similar al encontrado en el muestreo de las 48 h.

El número de BTCBS/10 ml de *V. alginolyticus* presentó una respuesta similar a lo encontrado en 1 ml, puesto que posterior a la inoculación se encontraron concentraciones superiores a  $1 \times 10^4$  BTCBS/10 ml y a partir de las 48 h de experimentación se presentó inhibición del crecimiento de este tipo de bacterias, alcanzando su inhibición total a partir de las 96 h y perduró hasta que la microalga alcanzó su fase estacionaria (Fig. 3a).

La inhibición de *V. campbellii* y *V. harveyi* requirió más tiempo que el que se necesitó para inhibir a *V. alginolyticus* (Fig. 12). Cabe señalar que esta diferencia en los tiempos requeridos por cada especie de bacteria para alcanzar su inhibición también se presentó en los cultivos con diatomeas y fue significativamente

diferente ( $p < 0.001$ ). Para *V. campbellii* la inhibición se presentó hasta el día cuatro del experimento (96 h post-inoculación) y el efecto se prolongó hasta que la curva de crecimiento de *I. galbana* inició la fase estacionaria. En este experimento también se encontraron diferencias altamente significativas en la concentración de BTCBS/ml ( $p < 0.001$ ). De igual manera a lo descrito para *V. alginolyticus*, en el primer muestreo con *V. campbellii* se registraron más de  $1 \times 10^3$  BTCBS/ml (Fig. 3b), esta tendencia se repitió para *V. harveyi* (Fig. 3c).

El número de bacterias heterotróficas inicial en los cultivos de *I. galbana* CCMP con *V. campbellii* se evaluó en  $2.1 \times 10^6$  UFC/ml en promedio y al paso de los días registró un incremento continuo hasta que finalizó con  $5.1 \times 10^6$  UFC/ml aproximadamente (Fig. 3b). De forma similar a lo descrito para el filtrado de 1 ml de cultivo, el número de BTCBS en 10 ml de *V. campbellii* disminuyó hasta su inhibición a las 96 horas post inoculación y el efecto también se conservó hasta que el crecimiento de *I. galbana* se detuvo y alcanzó una concentración promedio de  $3.6 \times 10^7$  células/ml (Fig. 3b). Para el caso de *V. harveyi*, la inhibición se presentó hasta el séptimo día de experimentación, alcanzando su inhibición total una vez que *I. galbana* se posicionó en fase estacionaria de crecimiento (Fig. 3c), y en la cual mantuvo una concentración de células promedio de  $3.7 \times 10^7$  células/ml.

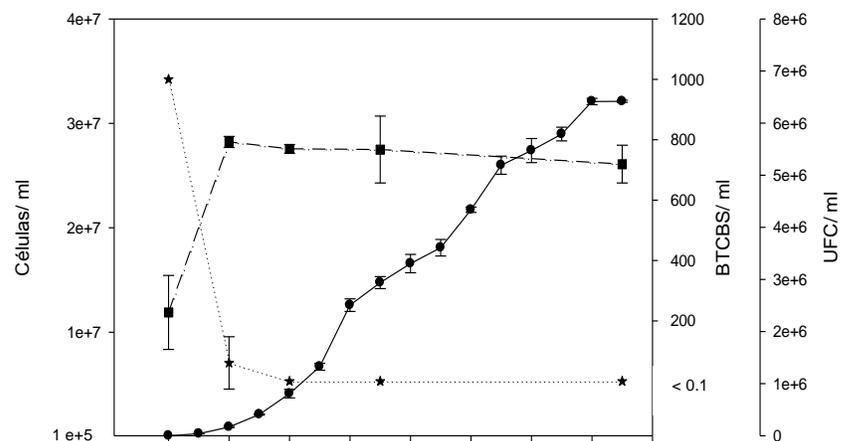
La densidad de bacterias heterotróficas de *V. harveyi* fue en valores de 2.1 a  $5.0 \times 10^6$  UFC/ml al inicio y al final del experimento respectivamente, alcanzando su máxima concentración al séptimo día con  $6.2 \times 10^6$  UFC/ml (Fig. 3c).

La densidad de BTCBS en los filtrados de 10 ml presentó una tendencia similar a lo descrito para los filtrados de 1 ml, encontrando concentraciones superiores a  $1 \times 10^4$  BTCBS/10 ml durante la mayor parte del experimento y lográndose la inhibición total de la bacteria únicamente hasta que el crecimiento de *I. galbana* alcanzó la fase de inicio del delineamiento del crecimiento (Figs. 4a, 4b y 4c). En

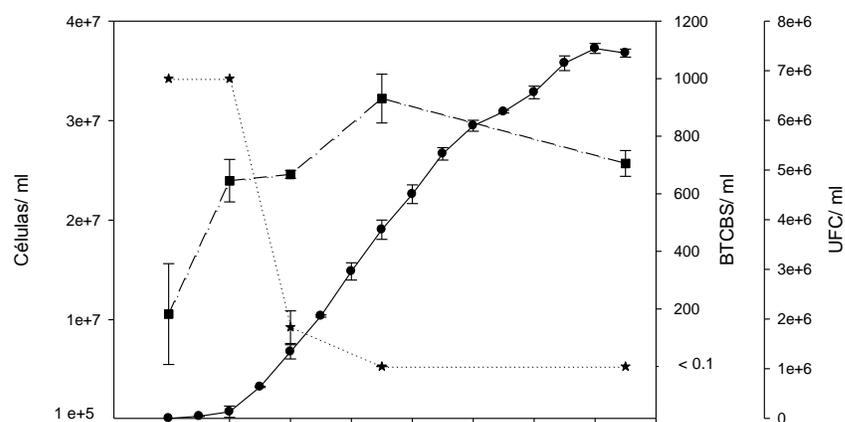
este experimento también fue posible encontrar diferencias altamente significativas ( $p < 0.001$ ) en la concentración de BTCBS/ml al inicio del experimento y al tiempo en el que se alcanzó el 90% de la inhibición total de la especie de bacteria (Tabla 5).

Las tendencias de inhibición en los filtrados de 10 ml mostradas por el resto de las especies de microalgas fueron las mismas a las observadas en los filtrados de 1ml. Por esta razón, en los siguientes experimentos se presentarán únicamente las gráficas de los filtrados de 1 ml. En la sección de Anexos se podrán encontrar las gráficas correspondientes a los filtrados de 10 ml.

a



b



c

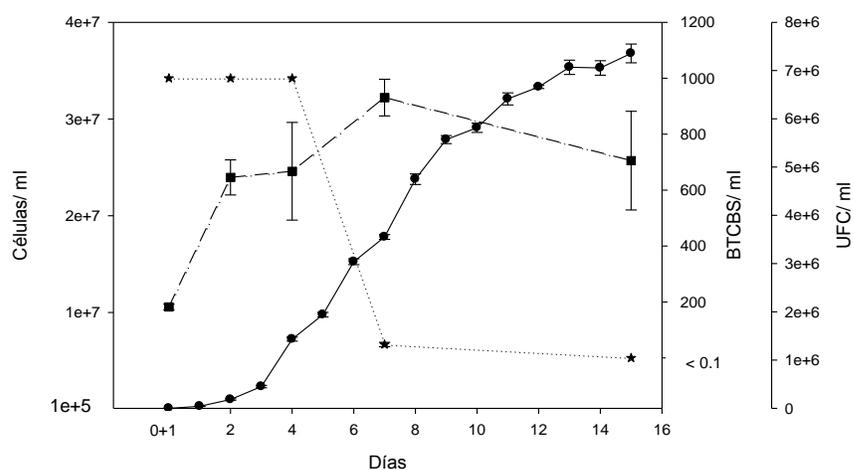


Figura 3.- Valores promedio y desviación estándar de la densidad de **a:** *V. alginolyticus*; **b:** *V. campbellii* y **c:** *V. harveyi* (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ ) cultivadas en conjunto con *I. galbana* CCMP (●).

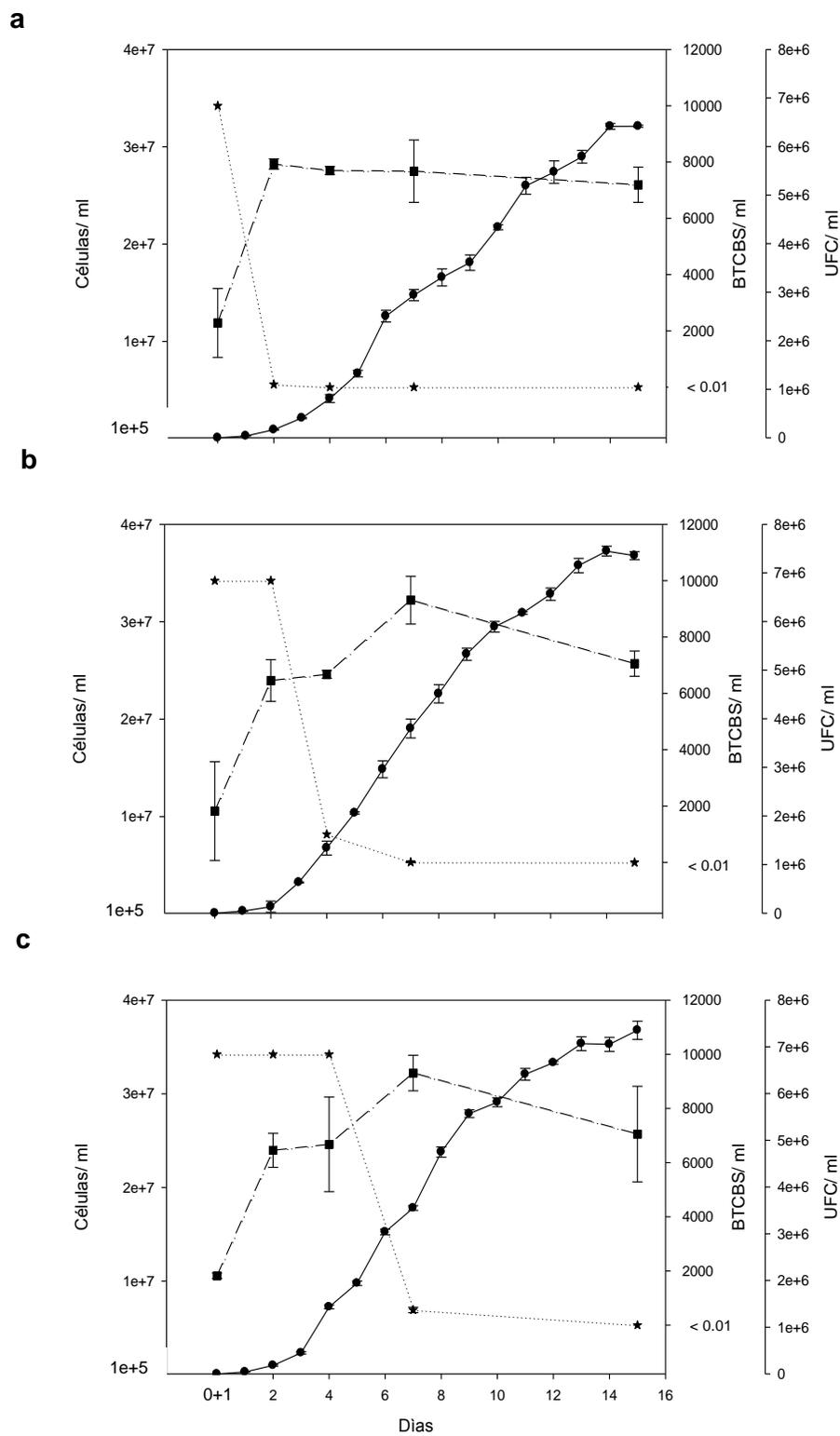


Figura 4.- Valores promedio y desviación estándar de la densidad de **a:** *V. alginolyticus*; **b:** *V. campbellii* y **c:** *V. harveyi* (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ ) cultivadas en conjunto con *I. galbana* CCMP (●) en filtrados de 10 ml.

### V.3. Selección de especies de diatomeas cultivadas en medio “E” a dos temperaturas

Las especies de diatomeas que presentaron tasas de crecimiento ( $\mu$ ) estadísticamente mayores ( $p < 0.05$ ) al ser cultivadas a 28 °C en medio “E” corresponden a *Nitzschia laevis* (B), *Navicula byskanterae*, la Cepa 2B, *Nitzschia frustulum* var. *perminuta* y la Cepa 5B. Un resumen detallado del promedio de las tasas de crecimiento para cada especie de diatomea en las dos temperaturas de cultivo se resume en la tabla 2. Adicionalmente, debido al potencial que se ha encontrado en esta especie como agente de biocontrol, se incluyó en la selección a *Navicula incerta*.

Tabla II.- Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) de diferentes especies de diatomeas bentónicas cultivadas a dos temperaturas de cultivo en medio "E". Letras iguales indican falta de diferencia significativa, *t*-Student de una vía  $\alpha = 0.05$ : a > b y probabilidad: *p*.

Especie	$\mu$ a 28 °C	$\mu$ a 20 °C	<i>p</i>
<i>Nitzschia laevis</i> (A)	0.107 ± 0.011	0.127 ± 0.006	0.057
<i>Nitzschia laevis</i> (B)	0.114 ± 0.006 a	0.087 ± 0.004 b	0.003
<i>Nitzschia laevis</i> (C)	0.076 ± 0.006	0.102 ± 0.006	0.007
<i>Nitzschia fonticola</i> var. <i>perminuta</i>	0.096 ± 0.008	0.129 ± 0.006	0.006
<i>Nitzschia</i> sp.	0.238 ± 0.019	0.228 ± 0.030	0.677
<i>Nitzschia laevis</i> (Cepa 4)	0.084 ± 0.019	0.154 ± 0.013	0.007
<i>Navicula incerta</i>	0.191 ± 0.030	0.199 ± 0.014	0.718
<i>Navicula byskanterae</i>	0.129 ± 0.004 a	0.080 ± 0.005 b	0.001
Cepa 2B	0.179 ± 0.003 a	0.137 ± 0.003 b	0.001
Cepa RB	0.183 ± 0.014	0.181 ± 0.079	0.963
<i>Amphiprora paludosa</i> var. <i>hyalina</i>	0.034 ± 0.004	0.097 ± 0.020	0.001
<i>Nitzschia frustulum</i> var. <i>perminuta</i>	0.084 ± 0.005 a	0.053 ± 0.002 b	0.001
Cepa 5B	0.117 ± 0.004 a	0.020 ± 0.010 b	0.001

## V.4. Ensayos de inhibición del crecimiento de *Vibrio* spp. con diatomeas bentónicas

### V.4.1 Crecimiento de las especies de diatomeas bentónicas seleccionadas

La curva de crecimiento de las seis especies de diatomeas seleccionadas se presenta en la figura 5. Las especies que alcanzaron una mayor densidad de células corresponden a *N. laevis* y *N. frustulum* var. *perminuta*, las cuales registraron en promedio  $2.4 \times 10^6$  y  $2.1 \times 10^6$  células/ml respectivamente. Las especies *N. incerta*, *N. byskanterae* y la Cepa 2B alcanzaron densidades celulares similares, las cuales se evaluaron entre  $1.7$  y  $1.85 \times 10^6$  células/ml en promedio. Respecto a la Cepa 5B la mayor cantidad de células se obtuvo al noveno día de cultivo y presentó un menor crecimiento respecto a las demás especies de diatomeas. Para esta especie, la máxima concentración fue de  $1.2 \times 10^6$  células/ml y alcanzó su fase estacionaria al cabo de nueve días al igual que la especie *N. frustulum* var. *perminuta*. En cuanto a los cultivos de las especies *N. incerta*, *N. laevis*, Cepa 2B y *N. byskanterae* la fase estacionaria se alcanzó a los siete días.

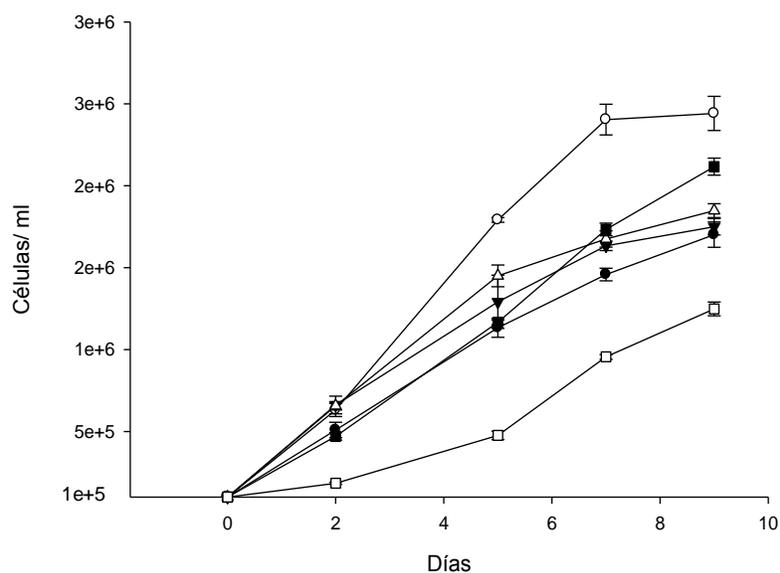


Figura 5.- Valores promedio y desviación estándar de la densidad de células de las seis especies de diatomeas bentónicas seleccionadas y mantenidas en cultivos estáticos. *N. incerta* (●), *N. laevis* (○), *N. byskanterae* (▼), Cepa 2B (Δ), *N. frustulum* var. *perminuta* (■) y Cepa 5B (□).

Se detectaron diferencias altamente significativas ( $p < 0.001$ ) en el crecimiento de las seis especies de diatomeas e *I. galbana* CCMP (Tabla 3).

Tabla III.- Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular máxima (DCM) ( $10^6$ ) y de la tasa de crecimiento de *I. galbana* y seis especies de diatomeas bentónicas cultivadas sin cepas de bacterias. Letras iguales indican falta de diferencia significativa, ANOVA de una vía  $\alpha = 0.05$ : a > b y probabilidad:  $p$ .

Microalga	DCM	$\mu$	$p$
<i>N. incerta</i>	1.7 ± 0.07	0.25 ± 0.03 cd	
<i>N. laevis</i>	2.4 ± 0.10	0.27 ± 0.01 bc	
<i>N. byskanterae</i>	1.7 ± 0.05	0.20 ± 0.01 d	<0.001
<i>Cepa 2B</i>	1.8 ± 0.04	0.21 ± 0.01 d	
<i>N. frustulum</i> var. <i>perminuta</i>	2.1 ± 0.05	0.31 ± 0.01 b	
<i>Cepa 5B</i>	1.2 ± 0.04	0.39 ± 0.01 a	

#### V.4.2 Inhibición del crecimiento de *Vibrio* spp. en cultivos de *Navicula incerta*

Los filtrados de 1 y 10 ml previos a la inoculación con las bacterias resultaron libres de BTCBS en todos los cultivos de las especies de diatomeas seleccionadas, al no presentarse el crecimiento de colonias en las cajas de Petri con medio TCSBS.

*N. incerta* presentó diferencias significativas en su crecimiento al ser cultivada monoespecíficamente o en combinación con *V. alginolyticus* y *V. harveyi*. Se tuvieron tasas de crecimiento significativamente mayores ( $p < 0.0001$ ) en los cultivos en conjunto con las dos especies de *Vibrio* (Tabla 4).

En los cultivos con *N. incerta* la respuesta de inhibición de *V. alginolyticus*, *V. campbellii* y *V. harveyi* se presentó a partir del cuarto día en los filtrados de 1 ml (Figs. 6a, 6b y 6c respectivamente) y se mantuvo hasta que el crecimiento de *N. incerta* alcanzó la fase estacionaria. Se encontraron diferencias altamente significativas ( $p < 0.001$ ) en la concentración de BTCBS/ml al inicio y al 90% de inhibición de cada especie de bacteria en todos los experimentos (Tabla 5). En el experimento con *V. alginolyticus* esta especie de diatomea alcanzó dicha fase al cabo de 11 días, con una densidad celular aproximada de  $2 \times 10^6$  células/ml y presentó una concentración de bacterias heterotróficas inicial de  $5 \times 10^5$  UFC/ml y final de  $2 \times 10^7$  UFC/ml en los filtrados de 1 ml.

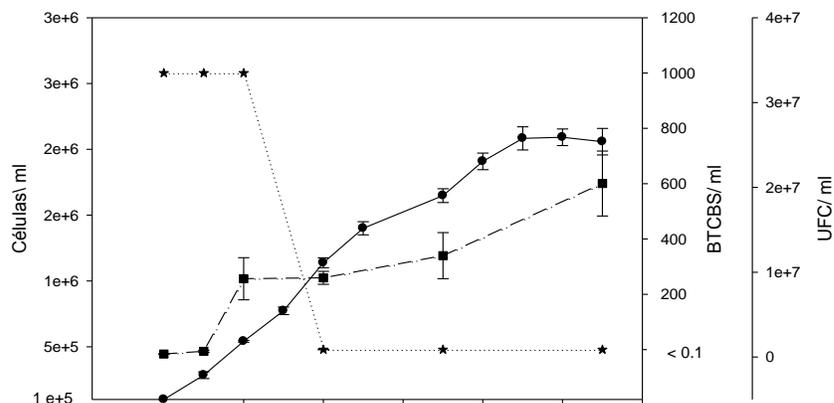
En el experimento con *V. campbellii* el cultivo de *N. incerta* alcanzó la fase estacionaria después de 11 días, con una densidad celular promedio de a  $1.5 \times 10^6$  células/ml, partiendo con una concentración de bacterias heterotróficas cercana a  $8 \times 10^6$  UFC/ml y finalizando con  $1.5 \times 10^7$  UFC/ml (Fig. 6b).

El valor máximo de densidad de células de *N. incerta* en el ensayo de crecimiento en conjunto con *V. harveyi*, fue en promedio de  $2 \times 10^6$  células/ml al día 11, tiempo

necesario para que el cultivo alcanzara la fase estacionaria. A este tiempo la concentración de bacterias heterotróficas fue de  $3 \times 10^7$  UFC/ml en promedio (Fig. 6c).

En los ensayos de inhibición con *V. campbellii* se presentó una densidad celular promedio de  $2 \times 10^6$  células/ml al onceavo día de cultivo, tiempo en el que se alcanzó la fase estacionaria, en tanto que los conteos iniciales de bacterias heterotróficas indicaron una concentración promedio de  $4.6 \times 10^5$  UFC/ml y se registraron  $6 \times 10^7$  UFC/ml en los conteos de bacterias heterotróficas a final del experimento (Fig. 6b). La tendencia de inhibición en los filtrados de 10 ml se muestra en la sección de Anexos (Fig. 13)

a



b

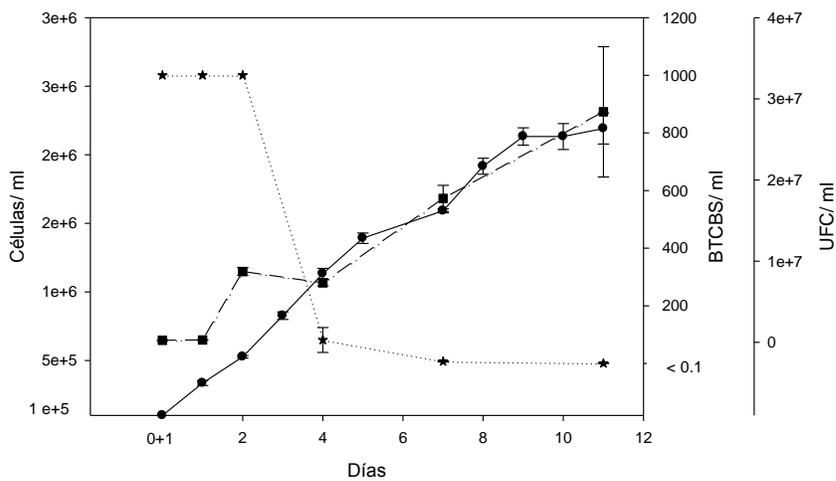
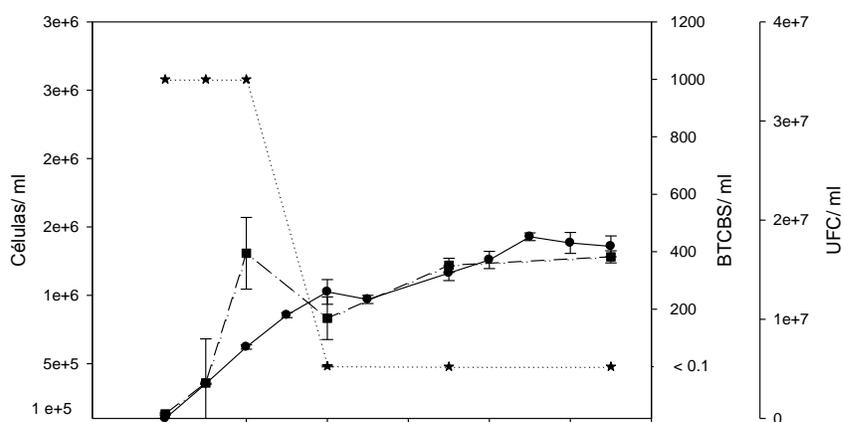


Figura 6.- Valores promedio y desviación estándar de la densidad de **a:** *V. alginolyticus*; **b:** *V. campbellii* y **c:** *V. harveyi* (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ ) cultivadas en conjunto con *N. incerta* (●).

### V.4.3 Inhibición del crecimiento de *Vibrio* spp. en cultivos de *Nitzschia laevis* cepa C

Los experimentos de *N. laevis* cultivada en conjunto con *V. campbellii* mostraron diferencias altamente significativas en su crecimiento ( $p < 0.001$ ), respecto a aquellos cultivos con las demás cepas bacterianas. Cabe señalar que en esta especie de microalga el crecimiento con *V. harveyi* y el obtenido en los cultivos libres de bacterias no mostró diferencias significativas (Tabla 4).

En los cultivos con *N. laevis* cepa C la respuesta inhibitoria en los filtrados de 1 ml se presentó a partir del día cuatro en los cultivos con *V. alginolyticus* y *V. campbellii* (Figs. 7a y 7b respectivamente), mientras que en el reto con *V. harveyi* el efecto de inhibición se observó a partir del día siete, esto es, durante la fase exponencial del cultivo de *N. laevis* (Fig. 7c) y se conservó en todos los retos con *Vibrio* hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria. En todos los experimentos fue posible detectar diferencias altamente significativas ( $p < 0.001$ ) en la concentración de BTCBS/ml al inicio de los experimentos y al alcanzar el 90% de inhibición de las especies de bacterias (Tabla 5).

En el experimento con *V. alginolyticus* se presentó una densidad celular promedio cercana a  $1.6 \times 10^6$  células/ml a los 10 diez días de haber iniciado el reto. A este tiempo el cultivo alcanzó la fase estacionaria y se encontró una concentración de bacterias heterotróficas de  $6 \times 10^7$  UFC/ml en promedio en dicha fase, mientras que al inicio del experimento se contaron en promedio  $3.5 \times 10^5$  UFC/ml (Fig. 7a).

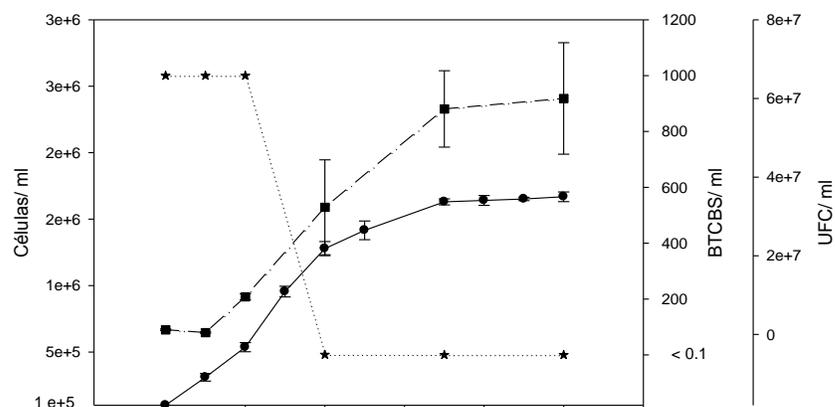
En los ensayos de inhibición con *V. campbellii* se presentó una densidad celular promedio de  $2 \times 10^6$  células/ml al onceavo día de cultivo, tiempo en el que se alcanzó la fase estacionaria, en tanto que los conteos iniciales de bacterias heterotróficas indicaron una concentración promedio de  $4.6 \times 10^5$  UFC/ml y se

registraron  $6 \times 10^7$  UFC/ml en los conteos de bacterias heterotróficas a final del experimento (Fig. 7b).

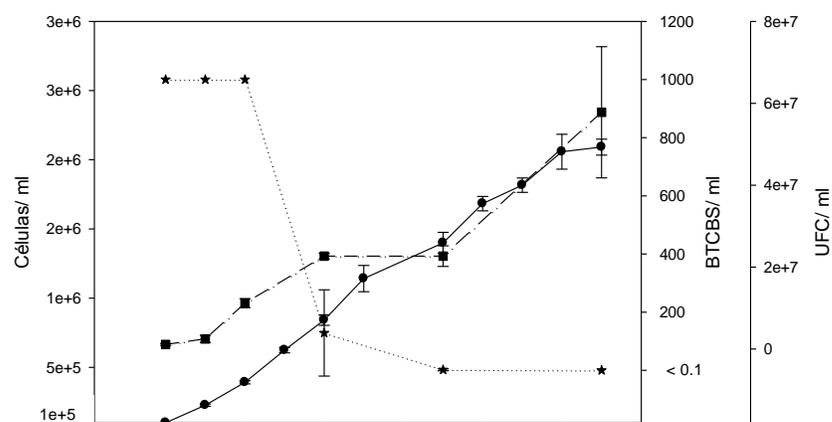
Para el experimento de inhibición realizado con *V. harveyi*, los conteos de *N. laevis* indicaron una densidad celular promedio de  $3 \times 10^6$  células/ml al día 11, tiempo requerido por que *N. laevis* llegara a la fase estacionaria. En esta fase se registró una concentración de bacterias heterotróficas promedio de  $3 \times 10^7$  UFC/ml, misma que partió de  $2.3 \times 10^5$  UFC/ml (Fig. 7c).

La tendencia de inhibición en los filtrados de 10 ml para esta especie de microalga se presenta en la sección de Anexos, en la figura 14.

a



b



c

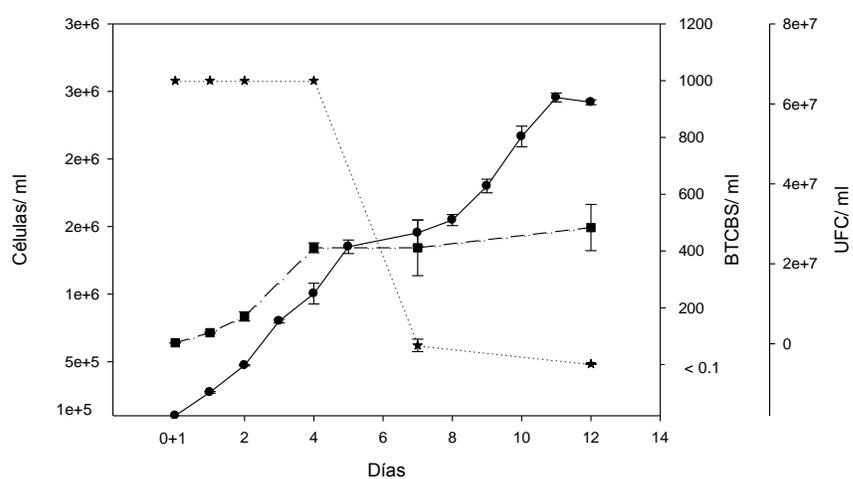


Figura 7.- Valores promedio y desviación estándar de la densidad de **a:** *V. alginolyticus*; **b:** *V. campbellii* y **c:** *V. harveyi* (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ ) cultivadas en conjunto con *N. laevis* cepa C (●).

#### V.4.3 Inhibición del crecimiento de *Vibrio* spp. en cultivos de *Navicula byskanterae*

En los ensayos con *N. byskanterae* fueron los que presentaron una respuesta de inhibición más rápida con *V. alginolyticus* (Fig. 8a), al segundo día de cultivo, en tanto que para *V. campbellii* (Fig. 8b) y *V. harveyi* (Fig. 8c) la respuesta fue a partir del cuarto y séptimo día de cultivo. Al igual que en las otras especies de microalgas descritas anteriormente, el efecto inhibitorio se mantuvo hasta que los cultivos se encontraron en fase estacionaria y se encontraron diferencias altamente significativas ( $p < 0.001$ ) en la concentración de BTCBS/ml al inicio y al alcanzar el 90% de inhibición (Tabla 5).

Los cultivos de *N. byskanterae* retados con *V. alginolyticus* presentaron densidades celulares próximas a  $1.6 \times 10^6$  células/ml, alcanzando la fase estacionaria en el día nueve (Fig. 8a). A este tiempo, la cantidad de bacterias heterotróficas presentes fue de  $6 \times 10^7$  UFC/ml en promedio, iniciando el experimento con  $1.2 \times 10^6$  UFC/ml.

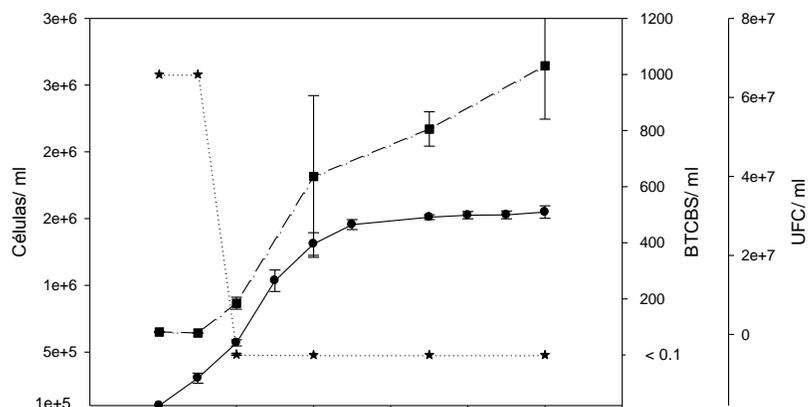
La cantidad de células presentes en los cultivos de *N. byskanterae* desafiados con *V. campbellii* presentó valores próximos a  $2 \times 10^6$  células/ml al día 10, tiempo en el que se alcanzó la fase estacionaria. La adición de *V. campbellii* a los cultivos de esta especie de microalga incentivó su tasa de crecimiento, encontrando diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) en la misma (Tabla 4). En esta fase, el número de bacterias heterotróficas fue cerca de  $6 \times 10^7$  UFC/ml (Fig. 8b), y en los conteos iniciales se registraron  $1 \times 10^6$  UFC/ml en promedio.

En el experimento con *V. harveyi* la respuesta inhibitoria comenzó a partir del día cuatro en los filtrados de 1 ml y para el día siete la concentración de BTCBS fue cercana a 0.1 BTCBS/ml (Fig. 8c). Cabe señalar que el crecimiento de *N. byskanterae* alcanzó su fase estacionaria después de 10 días y el efecto inhibitorio

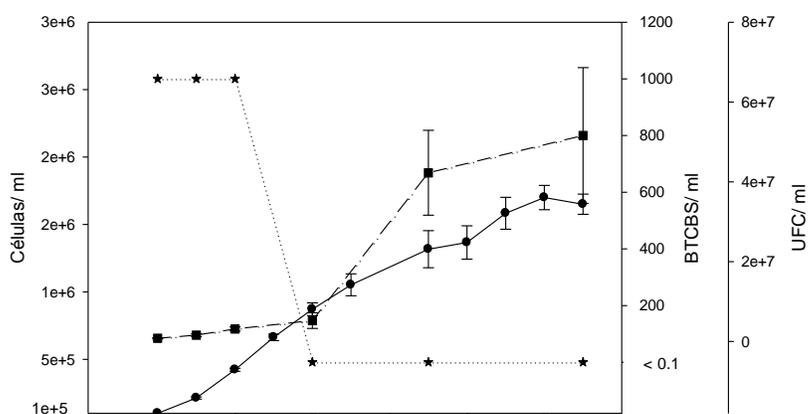
sobre *V. harveyi* se conservó. En cuanto a la concentración de bacterias heterotróficas se observó una concordancia con el crecimiento de la microalga, puesto que al principio del experimento se contaron  $2.7 \times 10^5$  UFC/ml y al final del experimento se alcanzaron  $1.7 \times 10^7$  UFC/ml.

La tendencia de inhibición para esta especie de microalga en los filtrados de 10 ml se presenta en la sección de anexos en la figura 15.

a



b



c

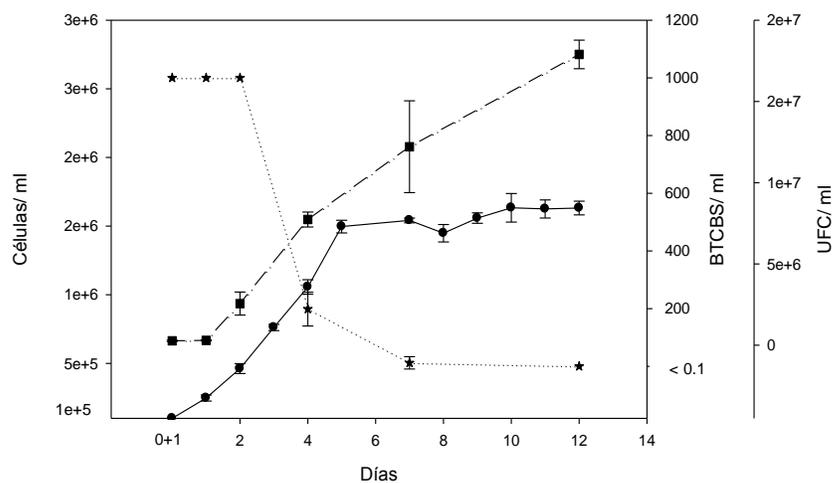


Figura 8.- Valores promedio y desviación estándar de la densidad de **a:** *V. alginolyticus*; **b:** *V. campbellii* y **c:** *V. harveyi* (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■) cultivadas en conjunto con *N. byskantera* (●).

#### V.4.4 Inhibición del crecimiento de *Vibrio* spp. en cultivos de la cepa 2B

La cepa 2B presentó actividad antibacteriana contra las tres cepas de *Vibrio* a partir del cuarto día. En el reto con *V. alginolyticus*, la microalga alcanzó la fase estacionaria al día 10 con una densidad celular promedio de  $1.6 \times 10^6$  células/ml. La cantidad de BTCBS disminuyó hasta concentraciones menores a 0.1 BTCBS/ml a partir del cuarto día en los filtrados de 1 ml, conservándose el efecto durante el resto de la fase exponencial y en la fase estacionaria del crecimiento de esta especie de microalga.

La concentración de bacterias heterotróficas inicial se evaluó en  $5.2 \times 10^5$  UFC/ml y al final del experimento se encontraron concentraciones elevadas de este tipo de bacterias, llegando inclusive a  $5.2 \times 10^7$  UFC/ml (Fig. 9a). La tendencia observada en los filtrados de 10 ml fue la misma a la que se presentó en los filtrados de 1 ml, tal y como se aprecia en la figura 16a de la sección de anexos.

La adición de *V. campbellii* y *V. harveyi* a los cultivos de la cepa 2B favoreció su crecimiento, al encontrarse diferencias altamente significativas en los experimentos con estas bacterias ( $p < 0.001$ ). Para esta especie de microalga, el crecimiento fue estadísticamente menor al cultivarse sin bacterias y en combinación con *V. alginolyticus* (Tabla 4).

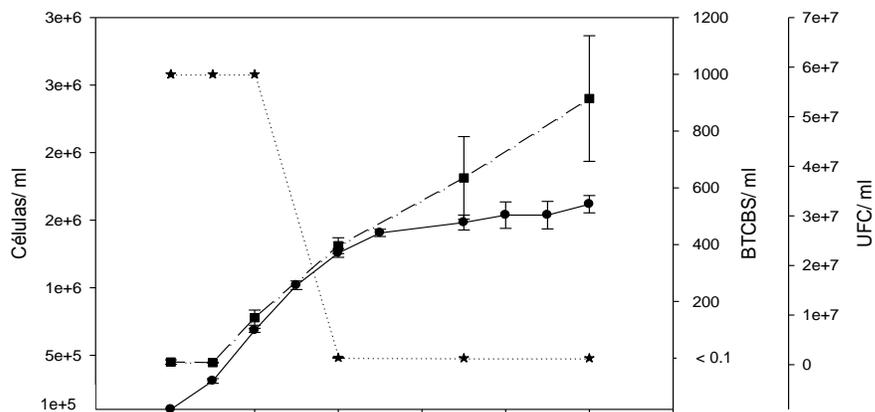
La inhibición de *V. campbellii* en los filtrados de 1 ml se evidenció al séptimo día de cultivo y perduró hasta el inicio de la fase estacionaria del crecimiento de la cepa 2B. Tal fase se presentó al décimo día, con una densidad promedio de  $1.7 \times 10^6$  células/ml y una concentración de bacterias heterotróficas de  $5 \times 10^7$  UFC/ml. Al igual que en los experimentos anteriores, se observó un incremento de bacterias heterotróficas conforme la cantidad de células de la cepa 2B aumentó (Fig. 9b). En este experimento la cantidad de bacterias heterotróficas inicial fue de  $7.6 \times 10^5$  UFC/ml en promedio. La tendencia observada en los filtrados de 10 ml

concuerta con lo anteriormente descrito y se presenta en la figura 16b de la sección de anexos.

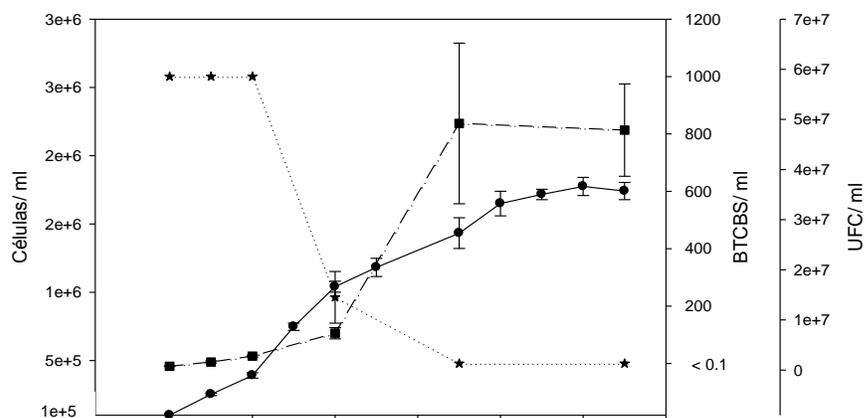
En cuanto a los experimentos realizados con *V. harveyi*, se observaron tendencias similares a lo encontrado en los ensayos de inhibición realizados con *V. campbellii*. Se observó que al séptimo día de cultivo la inhibición de *V. harveyi* fue evidente en los filtrados de 1 ml (Fig. 9c) y 10 ml (Fig. 16c sección de anexos) y tal efecto se conservó hasta el inicio de la fase estacionaria del cultivo de la microalga. En todos los ensayos con esta especie de microalga fue posible detectar diferencias altamente significativas ( $p < 0.001$ ) en la concentración de BTCBS/ml (Tabla 5).

El crecimiento de la cepa 2B en los cultivos retados con *V. harveyi* se presentaron densidades cercanas a  $2.2 \times 10^6$  células/ml al cabo de diez días, los cuales fueron necesarios para que el crecimiento de la microalga se posicionara en la fase estacionaria. Los conteos iniciales de bacterias heterotróficas para esta especie fueron de  $4.5 \times 10^5$  UFC/ml en promedio y finalizando al día 10 con  $2.8 \times 10^7$  UFC/ml en promedio (Fig. 9c).

a



b



c

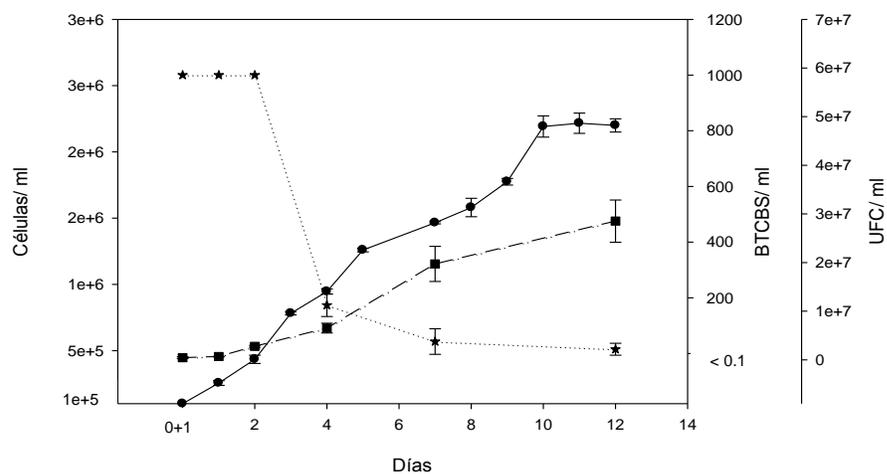


Figura 9.- Valores promedio y desviación estándar de la densidad de **a:** *V. alginolyticus*; **b:** *V. campbellii* y **c:** *V. harveyi* (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ ) cultivadas en conjunto con la cepa 2B (●).

#### **V.4.5 Inhibición del crecimiento de *Vibrio* spp. en cultivos de *N. frustulum* var. *perminuta***

Respecto a *N. frustulum* var. *perminuta* se encontraron diferencias significativas en el crecimiento ( $p < 0.001$ ) bajo las diferentes condiciones experimentales. Los resultados indicaron un menor crecimiento con *V. alginolyticus* y *V. campbellii*, en tanto que los cultivos que estuvieron expuestos a *V. harveyi* no mostraron diferencias a aquellos que no estuvieron expuestos a alguna cepa bacteriana (Tabla 4).

La capacidad inhibitoria de *N. frustulum* var. *perminuta* sobre las bacterias de estudio se presentó en todos los retos a partir del día cuatro. En los ensayos con *V. alginolyticus*, la cantidad de bacterias patógenas en los filtrados de 1 ml disminuyó de manera significativa ( $p < 0.001$ ) hasta concentraciones cercanas a 0.01 BTCBS/ml justo al cuarto día. En los muestreos subsecuentes la inhibición de las bacterias continuó hasta que los cultivos de esta especie de microalga alcanzaron la fase estacionaria. Para alcanzar esta fase, se requirieron ocho días, en los que *N. frustulum* var. *perminuta* alcanzó concentraciones de  $1.7 \times 10^6$  células/ml en promedio (Fig. 10a).

En cuanto a la concentración de bacterias heterotróficas, los conteos iniciales indicaron la presencia de  $9.1 \times 10^5$  UFC/ml, cantidad que se incrementó conforme el crecimiento de la microalga avanzó. Para el muestreo final, la concentración de bacterias heterotróficas se evaluó en  $3.5 \times 10^7$  UFC/ml.

La tendencia de inhibición de *V. alginolyticus* por *N. frustulum* var. *perminuta* observada en los filtrados de 10 ml fue la misma que la evaluada en los filtrados de 1 ml (Figura 17a sección anexos).

Con *V. campbellii* el efecto inhibitorio de *N. frustulum* var. *perminuta* también dio inicio en el cuarto día y, en los muestreos posteriores, el número de BTCBS disminuyó hasta concentraciones significativamente menores ( $p < 0.001$ ) a 0.1 BTCBS/ml en los filtrados de 1 ml. Al igual que en las demás especies de microalgas estudiadas, el efecto inhibitorio se conservó inclusive hasta que el crecimiento de esta especie de microalga alcanzó la fase estacionaria (Fig. 10b).

Respecto el crecimiento de *N. frustulum* var. *perminuta* fue menos acelerado que en el observado con *V. alginolyticus*, puesto que para llegar a la fase estacionaria se necesitaron 12 días, tiempo al que se estimó una concentración final máxima de  $2.3 \times 10^6$  células/ml.

Los cultivos en este experimento con *V. campbellii* iniciaron con una concentración de bacterias heterotróficas de  $2.2 \times 10^5$  UFC/ml y al finalizar el experimento se encontraron  $2.1 \times 10^7$  UFC/ml (Fig. 10b).

Similar a los resultados con las dos especies de bacterias anteriores, la respuesta inhibitoria contra *V. harveyi* inició al cuarto día de iniciado el experimento y gradualmente la concentración de BTCBS disminuyó hasta que se encontraron concentraciones menores a 0.1 BTCBS/ml. Estas bajas concentraciones de bacterias se mantuvieron hasta que el cultivo de *N. frustulum* var. *perminuta* alcanzó la fase estacionaria en los filtrados de 1 ml y fueron diferentes ( $p < 0.001$ ) a la concentración inicial (Tabla 5). Para alcanzar esta fase de crecimiento celular se necesitaron 10 días, con densidades celulares de  $2.2 \times 10^6$  células/ml (Fig. 10c). En los filtrados de 10 ml la respuesta inhibitoria fue concordante con la antes descrita (Figura 17c sección de anexos).

Las bacterias heterotróficas presentes al inicio del experimento con *V. harveyi* fueron en promedio de  $2.4 \times 10^5$  UFC/ml, mientras que al finalizar el experimento se encontraron concentraciones cercanas a  $3.5 \times 10^7$  UFC/ml (Fig. 10c).

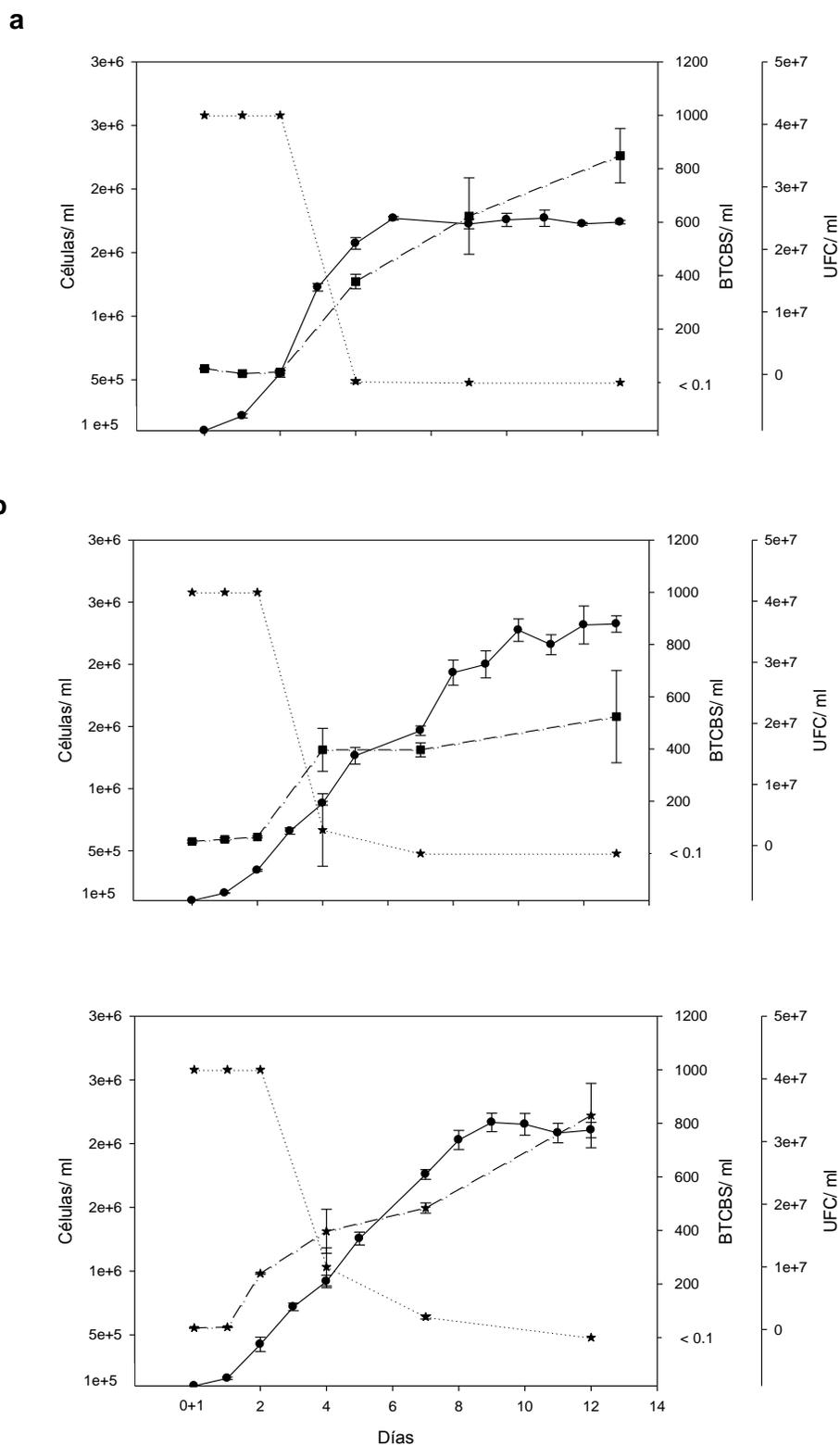


Figura 10.- Valores promedio y desviación estándar de la densidad de **a:** *V. alginolyticus*; **b:** *V. campbellii* y **c:** *V. harveyi* (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ ) cultivadas en conjunto con *N. frustulum* var. *perminuta* (●).

#### V.4.6 Inhibición del crecimiento de *Vibrio* spp. en cultivos de la cepa 5B

Para la cepa 5B la adición de bacterias del género *Vibrio* disminuyó su crecimiento ( $p < 0.001$ ), siendo *V. alginolyticus* la cepa de bacteria que más afectó al crecimiento de la especie de microalga (Tabla 4).

La actividad inhibitoria de la cepa 5B contra *V. alginolyticus* se observó cuatro días post-inoculación con la bacteria. Semejante a lo descrito en los experimentos con las demás especies de microalgas utilizadas, el efecto inhibitorio perduró hasta que los cultivos de la cepa 5B alcanzaron su fase estacionaria, en la cual se obtuvieron concentraciones de BTCBS próximas a 0.1 BTCBS/ml en los filtrados de 1 ml (Fig. 11a). Esta tendencia también se repitió en los filtrados de 10 ml (Fig. 18a sección anexos). Respecto al crecimiento de la cepa 5B, se requirieron 13 días para que alcanzara su fase estacionaria, en la cual se evaluó una concentración promedio de  $1.4 \times 10^6$  células/ml.

La cantidad de bacterias heterotróficas presentes en los cultivos al inicio del experimento se estimó en  $4.8 \times 10^5$  UFC/ml, misma que al término del experimento se evaluó en  $3.2 \times 10^7$  UFC/ml (Fig. 11a).

En los filtrados de 1 ml, *V. campbellii* no inhibió su crecimiento si no hasta el séptimo día de cultivo, presentando concentraciones cercanas a 0.1 BTCBS/ml conservándose el efecto inhibitorio hasta que la cepa 5B disminuyó su crecimiento y alcanzó la fase estacionaria (Fig. 11b). Dicha fase se alcanzó después de 11 días de iniciado el experimento, con una densidad de células en promedio de  $1.6 \times 10^6$  células/ml. La concentración de bacterias heterotróficas en este reto inició en  $4.2 \times 10^5$  UFC/ml y finalizó al cabo de 13 días con  $5.5 \times 10^7$  UFC/ml.

La tendencia de inhibición de *V. campbellii* en los filtrados de 10 ml, confirma los resultados obtenidos en los filtrados de 1 ml (Figura 18b sección anexos).

En cuanto a *V. harveyi* se refiere, la respuesta inhibitoria se presentó a partir del séptimo día, esto es, durante la fase exponencial del cultivo de la cepa 5B. Análogo a los resultados obtenidos con las demás especies de microalgas, el efecto inhibitorio se conservó incluso hasta en la fase exponencial del crecimiento de la cepa 5B. Cabe señalar que al séptimo día las concentraciones de *V. harveyi* fueron cercanas a 57 BTCBS/ml, esto es en los filtrados de 10 ml y posteriormente, en el muestreo en la fase estacionaria la concentración de *V. harveyi* fue cercana a 0.1 en los filtrados de 1 ml (Fig. 11c). Estos resultados presentaron diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) respecto a las concentraciones de BTCBS/ml al inicio de los experimentos (Tabla 5).

En estos experimentos la cepa 5B alcanzó una densidad celular promedio de  $1.5 \times 10^6$  células/ml al cabo de 11 días de cultivo. La cantidad de bacterias heterotróficas presentes en los cultivos de la cepa 5B al inicio del experimento se estimó en  $3.4 \times 10^5$  UFC/ml en promedio y finalizó con una concentración promedio de  $1.7 \times 10^7$  UFC/ml en la fase estacionaria (Fig. 11c).

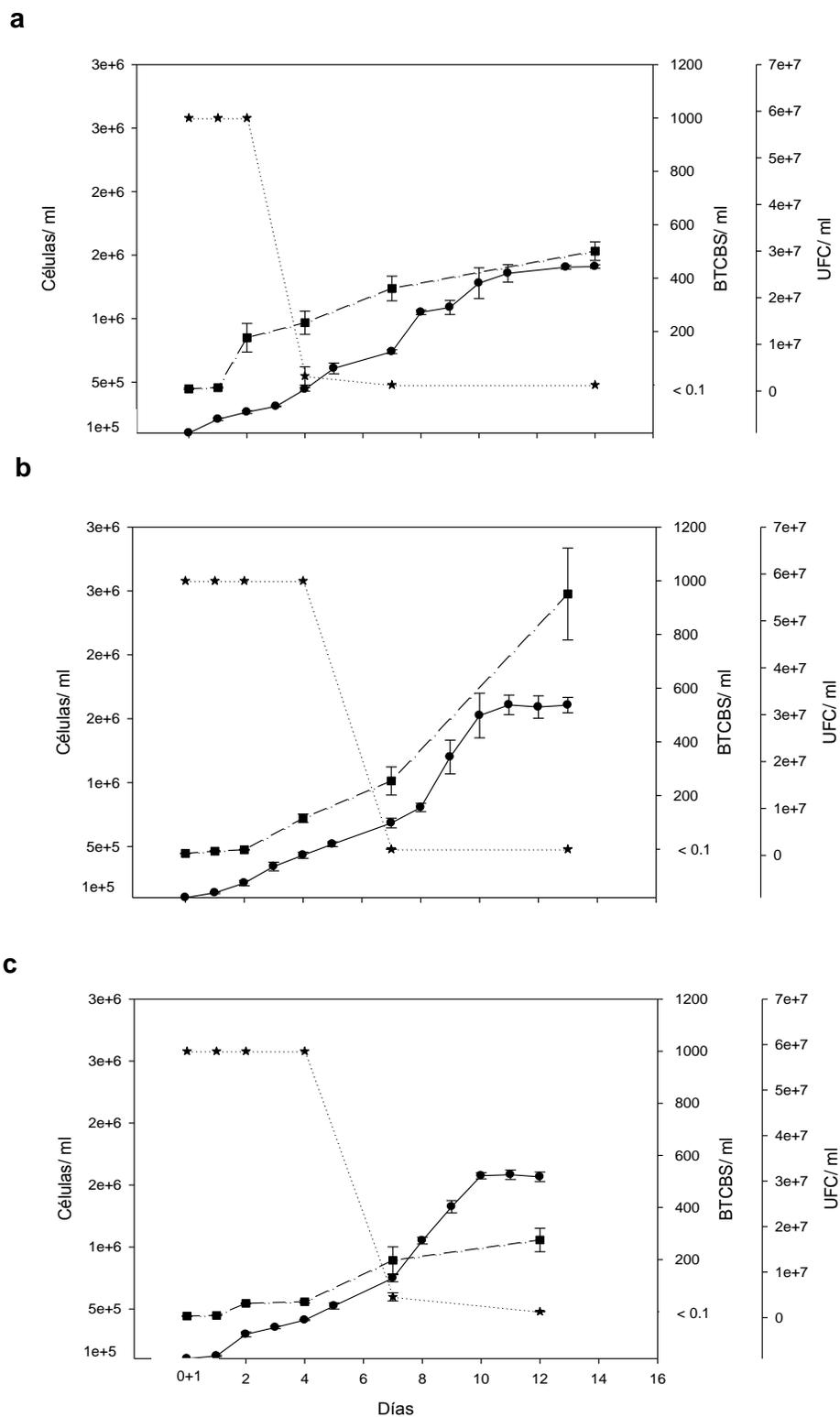


Figura 11.- Valores promedio y desviación estándar de la densidad de **a:** *V. alginolyticus*; **b:** *V. campbellii* y **c:** *V. harveyi* (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ ) cultivadas en conjunto con la cepa 5B (●).

Tabla IV.- Valores promedio y desviación estándar de las tasas de crecimiento ( $\mu$ ), densidad celular máxima (células/ml) alcanzadas en cultivos de distintas especies de microalgas en conjunto con diferentes cepas de bacterias *Vibrio* y tratamiento control sin bacterias. Letras iguales indican falta de diferencia significativa, ANOVA de una vía  $\alpha = 0.05$ : a >b>c y probabilidad: *p*.

Microalga	Bacteria	DCM	$\mu$	<i>p</i>
<i>I. galbana</i> CCMP	Sin bacteria	19.2 ± 0.30 c	0.55 ± 0.010 a	<0.001
	<i>V. alginolyticus</i>	32.1 ± 0.10 b	0.55 ± 0.006 a	
	<i>V. campbellii</i>	36.6 ± 0.40 a	0.50 ± 0.002 b	
	<i>V. harveyi</i>	36.6 ± 0.90 a	0.56 ± 0.014 a	
<i>N. incerta</i>	Sin bacteria	1.7 ± 0.07 b	0.25 ± 0.03 b	<0.001
	<i>V. alginolyticus</i>	2.0 ± 0.06 a	0.32 ± 0.01 a	
	<i>V. campbellii</i>	1.4 ± 0.03 c	0.25 ± 0.01 b	
	<i>V. harveyi</i>	2.1 ± 0.01 a	0.33 ± 0.01 a	
<i>N. laevis</i>	Sin bacteria	2.4 ± 0.10 a	0.27 ± 0.01 b	<0.001
	<i>V. alginolyticus</i>	1.6 ± 0.03 c	0.23 ± 0.01 c	
	<i>V. campbellii</i>	2.0 ± 0.12 b	0.31 ± 0.01 a	
	<i>V. harveyi</i>	2.4 ± 0.03 a	0.26 ± 0.01 b	
<i>N. byskanterae</i>	Sin bacteria	1.7 ± 0.05 a	0.20 ± 0.01 b	<0.01
	<i>V. alginolyticus</i>	1.5 ± 0.04 b	0.20 ± 0.01 b	
	<i>V. campbellii</i>	1.7 ± 0.09 a	0.25 ± 0.01 a	
	<i>V. harveyi</i>	1.6 ± 0.01 a	0.23 ± 0.02 b	
Cepa 2B	Sin bacteria	1.8 ± 0.04b	0.21 ± 0.01 b	<0.001
	<i>V. alginolyticus</i>	1.5 ± 0.09 c	0.16 ± 0.01 c	
	<i>V. campbellii</i>	1.7 ± 0.06 bc	0.27 ± 0.01 a	
	<i>V. harveyi</i>	2.2 ± 0.07 a	0.29 ± 0.01 a	
<i>N. frustulum</i> var. <i>perminuta</i>	Sin bacteria	2.1 ± 0.05 b	0.31 ± 0.01 a	<0.001
	<i>V. alginolyticus</i>	1.7 ± 0.11 c	0.20 ± 0.01 c	
	<i>V. campbellii</i>	2.3 ± 0.15 a	0.25 ± 0.01 b	
	<i>V. harveyi</i>	2.1 ± 0.07 ab	0.32 ± 0.01 a	
Cepa 5B	Sin bacteria	1.2 ± 0.04 c	0.39 ± 0.01 a	<0.001
	<i>V. alginolyticus</i>	1.4 ± 0.01 b	0.15 ± 0.01 c	
	<i>V. campbellii</i>	1.6 ± 0.07 a	0.27 ± 0.03 b	
	<i>V. harveyi</i>	1.5 ± 0.03 a	0.30 ± 0.01 b	

Los tiempos de inhibición de cada cepa de bacteria fueron diferentes ( $p < 0.001$ ). De manera general, *V. alginolyticus* fue la especie de bacteria que requirió menos días para obtener su inhibición ( $3.4 \pm 0.9$  días), seguida por *V. campbellii* ( $4.4 \pm 1.1$  días) y *V. harveyi* ( $5.7 \pm 1.5$  días) (Fig. 12).

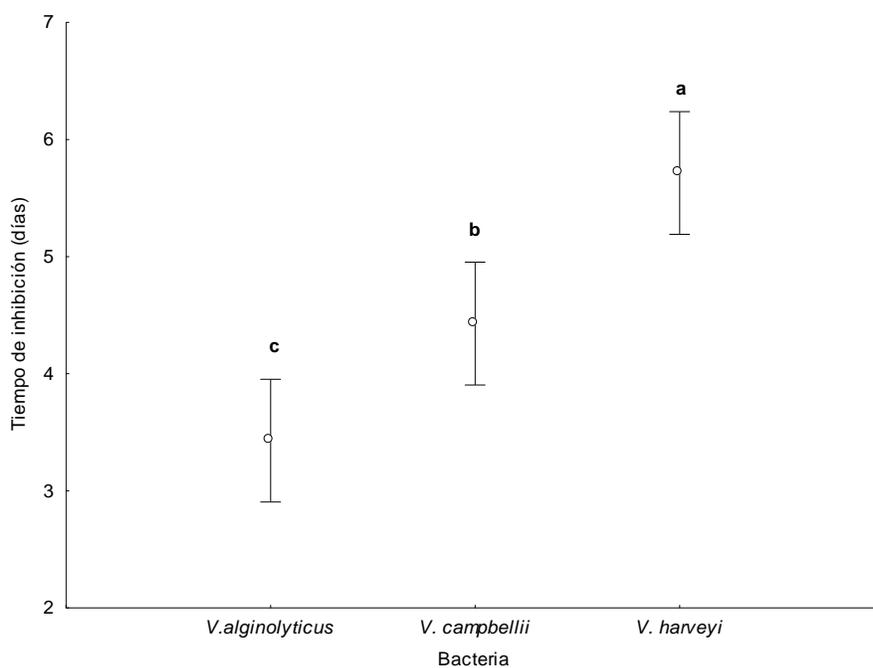


Figura 12.- Valores promedio y desviación estándar del tiempo de inhibición de *V. alginolyticus*, *V. campbellii* y *V. harveyi* cultivadas en conjunto con *I. galbana* CCMP, *N. incerta*, *N. laevis* cepa C, *N. byskanterrae*, la cepa 2B, *N. frustulum* var. *perminuta* y la cepa 5B.

Tabla V.- Valores promedio y desviación estándar de la densidad de bacterias que crecen en medio TCBS (BTCBS) al inicio ( $I_i$ ), tiempo en días (T), tiempo en días para alcanzar el 90% de inhibición de la bacteria ( $I_{90}$ ) y valor de probabilidad (p) para las pruebas t-Student ( $\alpha= 0.05$ ) para *I. galbana* CCMP, *N. incerta*, *N. laevis* cepa C, *N. byskanterae*, la cepa 2B, *N. frustulum* var. *perminuta* y la cepa 5B cultivadas en conjunto con *V. alginolyticus*, *V. campbellii* y *V. harveyi*.

Microalga	Bacteria	BTCBS/ ml $I_i$	BTCBS/ ml $I_{90}$	T	p
<i>I. galbana</i> CCMP	<i>V. alginolyticus</i>	$>10^3$	60.6 ± 86.7	2	$p < 0.001$
	<i>V. campbellii</i>	$>10^3$	136.5 ± 56.8	4	
	<i>V. harveyi</i>	$>10^3$	48 ± 7.8	7	
<i>N. incerta</i>	<i>V. alginolyticus</i>	$>10^3$	0.3 ± 0.57	4	
	<i>V. campbellii</i>	$>10^3$	2.0 ± 2.6	4	
	<i>V. harveyi</i>	$>10^3$	81.6 ± 43.2	4	
<i>N. laevis</i>	<i>V. alginolyticus</i>	$>10^3$	1.0 ± 0	4	
	<i>V. campbellii</i>	$>10^3$	2.0 ± 3.4	4	
	<i>V. harveyi</i>	$>10^3$	67.6 ± 22.0	7	
<i>N. byskanterae</i>	<i>V. alginolyticus</i>	$>10^3$	1.6 ± 2.8	2	
	<i>V. campbellii</i>	$>10^3$	4.8 ± 2.5	4	
	<i>V. harveyi</i>	$>10^3$	198.6 ± 58.5	4	
Cepa 2B	<i>V. alginolyticus</i>	$>10^3$	1.6 ± 2.0	4	
	<i>V. campbellii</i>	$>10^3$	230.6 ± 90.0	4	
	<i>V. harveyi</i>	$>10^3$	173.3 ± 40.0	4	
<i>N. frustulum</i> var. <i>perminuta</i>	<i>V. alginolyticus</i>	$>10^3$	4.3 ± 6.6	4	
	<i>V. campbellii</i>	$>10^3$	90.0 ± 138.6	4	
	<i>V. harveyi</i>	$>10^3$	264.0 ± 71.1	7	
Cepa 5B	<i>V. alginolyticus</i>	$>10^3$	33.6 ± 34.1	4	
	<i>V. campbellii</i>	$>10^3$	0.33 ± 0.57	7	
	<i>V. harveyi</i>	$>10^3$	0.33 ± 0.57	7	

## Capítulo VI

---

### Discusión

---

Las cepas de *I. galbana* utilizadas en el presente estudio mostraron diferencias en su crecimiento, siendo *I. galbana* CCMP la cepa que alcanzó la mayor densidad celular. Estas diferencias en el crecimiento se deben a que cada cepa proviene de un origen geográfico distinto con características fisicoquímicas diferentes y a que existe variabilidad genética entre cepas, lo cual repercute en las características biológicas como morfología, tolerancia a temperatura, tasa de crecimiento, calidad y composición de las células (López-Alonso *et al.*, 1994; Wikfors y Patterson, 1994; Sayegh *et al.*, 2007).

Aunado a estas diferencias propias de cada célula, el crecimiento de *I. galbana* CCMP así como de las diatomeas *N. incerta*, *N. frustulum* var. *perminuta*, la cepa 2B y la cepa 5B mejoró significativamente en algunos retos con bacterias tipo *Vibrio*. Además, la adición de estas bacterias a los cultivos de *I. galbana* CCMP contribuyó a retardar el inicio de la fase estacionaria de los cultivos y alcanzar una concentración de células cercana a  $3.6 \times 10^7$  células/ml, concentración superior a los  $1.9 \times 10^7$  células/ml encontradas en los cultivos libres de *Vibrio*, en tanto que en algunos de los experimentos con las diatomeas se presentaron mayores tasas de crecimiento y densidades celulares.

Se ha demostrado que en presencia de bacterias el crecimiento del fitoplancton es significativamente mayor a los cultivos axénicos. Estudios como los realizados por Grossart (1999) indican que la adición de bacterias a cultivos de *Thalassiosira weissflogii*, *Cylindrotheca fusiformis* y *Nitzschia laevis* favorece el crecimiento de estas especies e inclusive es posible duplicar el número de células en comparación con cultivos no expuestos a bacterias. Además, la actividad

microbiana en agregados y detritos puede conducir a una liberación de nitrato, amonio, fósforo y CO<sub>2</sub>, incrementando y manteniendo el crecimiento de los cultivos. Resultados similares a estos han sido descritos por diversos autores (Riquelme y Avedaño 1999; Schäfer *et al.* 2002; Grossart *et al.* 2006) quienes sugieren un efecto sinérgico entre las bacterias tipo *Vibrio* y las microalgas y afirman que las bacterias son las responsables del procesamiento del carbono orgánico particulado (COP) derivado del fitoplancton, de su posterior conversión a carbono orgánico disuelto (COD) y en la regeneración de nutrientes inorgánicos como el sílice y fósforo.

Recientemente Park *et al.* (2008) encontraron que el crecimiento de *Chlorella ellipsoidea* se multiplica en 0.5 a 3 veces cuando es inoculada en conjunto con bacterias del género *Brevundimonas*, y en parte atribuyen este efecto a procesos más eficientes de intercambio de ciertos sustratos entre las bacterias que se adhieren a las células fitoplanctónicas, dado que la adhesión de las bacterias a las células disminuye la distancia de difusión y resulta en un intercambio más rápido.

Las relaciones entre bacterias y microalgas no solo se limitan a procesos de remineralización de nutrientes. También se han descrito relaciones que van desde simbióticas vía comensalismo hasta inclusive parasitismo (Schäfer *et al.*, 2002). Existe evidencia de laboratorio de la existencia de la “ficósfera”, una zona en la que interactúan las bacterias y las microalgas en forma inhibitoria o estimulante debido a la liberación de compuestos extracelulares como son vitaminas (Cole, 1982; Croft *et al.*, 2005) y factores promotores o inhibidores del crecimiento (Baker *et al.*, 1978; Cole, 1982; Salvesen *et al.*, 2000; Riquelme y Avedaño, 2003). Este tipo de interacciones también son conocidas como relaciones alelopáticas o alelopatía, la cual se define como la liberación de sustancias químicas, también llamados aleloquímicos (Fistarol *et al.*, 2004), por parte de individuos de una población que tiene efectos en individuos de otra población (Hulot y Huisman,

2004). Este mecanismo es operativo cuando los compuestos bioactivos son excretados por células vivas, son efectivos a concentraciones naturales y existe una compensación entre el efecto sobre un individuo y el esfuerzo del otro para producirlo (van Rijssel *et al.*, 2008)

Estas relaciones alelopáticas son especie-específico y se ha demostrado que juegan un papel importante en de la competencia entre especies de fitoplancton, formación de afloramientos algales “blooms” y las sucesiones estacionales entre especies de microalgas en ambiente natural y en ensayos de laboratorio (Maestrini y Bonin, 1981; Fukami *et al.*, 1997; Fistarol *et al.*, 2004). Además cabe la posibilidad que las bacterias heterotróficas consuman sustancias que pueden ser inhibitoras del crecimiento de las diatomeas, facilitando la proliferación de las células fitoplanctónicas (Bruckner *et al.*, 2008).

En todos los experimentos se observó una disminución en la concentración de *Vibrio* spp., presentándose concentraciones indetectables en los cultivos de *I. galbana* CCMP con las tres especies de bacterias, en tanto que en los cultivos de diatomeas se obtuvieron concentraciones indetectables en los retos con *V. alginolyticus* y *V. campbellii*. En los retos con *V. harveyi* no se alcanzaron concentraciones indetectables en los cultivos de diatomeas, aunque la cantidad de bacterias disminuyó de manera altamente significativa en todos los cultivos. Existe evidencia de que la mayoría de las algas marinas producen metabolitos secundarios con actividad biológica sobre el crecimiento de bacterias, hongos virus y otros epibiontes (Liao *et al.*, 2003; Thillairajasekar *et al.*, 2009). Numerosos estudios se han enfocado a evaluar la capacidad inhibitoria de las microalgas sobre la concentración de bacterias patógenas tanto para organismos de importancia acuícola (Austin y Day, 1990; Naviner *et al.*, 1999; Lio-Po *et al.*, 2005; Makridis *et al.*, 2006), como para el humano (De Lara-Issasi, 1991; Herrero *et al.*, 2006; Desbois *et al.*, 2009; Sánchez-Saavedra *et al.*, 2010).

Entre las especies que han recibido gran atención debido a la producción de compuestos con actividad contra el crecimiento de bacterias pertenecientes al género *Vibrio* patógenas para organismos en cultivo se encuentran: *Tetraselmis* sp., *Skeletonema costatum*, *Chlorella minutissima*, *Chaetoceros muelleri*, *C. calcitrans*, *Nitzschia* sp., *Dunaliella* sp., *Navicula* sp. e *I. galbana* (Austin y Day, 1990; Rico-Mora *et al.*, 1998; Naviner *et al.*, 1999; Olsen *et al.*, 2000; Salvesen *et al.*, 2000; Lio-Po *et al.*, 2005; Huervana *et al.*, 2006; Makridis *et al.*, 2006; Eiler *et al.*, 2007; Terekhova *et al.*, 2009; Avila-Villa *et al.*, 2011).

Es preciso señalar que en algunos cultivos las concentraciones indetectables de *Vibrio* spp. se consiguieron durante la fase exponencial del crecimiento de las especies microalgas y tal efecto se conservó hasta que se los cultivos alcanzaron la fase estacionaria. En algunos otros experimentos, como en aquellos donde se realizaron cultivos en conjunto con *V. harveyi*, el efecto inhibitorio no se consiguió hasta que el crecimiento de las especies de microalgas alcanzó la fase estacionaria. Se ha visto que ciertos parámetros como la fase de crecimiento de cultivo, la densidad celular y la tasa de crecimiento exponencial pueden tener efectos sobre la actividad antibacteriana de una especie de microalga en particular (Sánchez-Saavedra *et al.*, 2010). En este sentido, algunos autores mencionan que en etapas donde el crecimiento de los cultivos es más lento, esto es durante el final de la fase exponencial y en la fase estacionaria, es cuando se produce la mayor cantidad de metabolitos orgánicos en comparación con la fase exponencial (Salvesen *et al.*, 2000; Skulberg, 2000; Terekhova *et al.*, 2009). Por esta razón, es posible que la cantidad de compuestos con actividad antimicrobiana liberados al medio sean mayores durante esta fase, resultando en las bajas concentraciones de bacterias tipo *Vibrio* encontradas. Explicaciones alternas a ésta incluyen la alta concentración de otras especies de bacterias encontradas en esta fase, las cuales tienen un efecto de exclusión competitiva al poseer una mayor capacidad para utilizar los exudados provenientes de las células fitoplanctónicas (Rico-Mora *et al.*, 1998; Salvesen *et al.*, 2000; Makridis *et al.*, 2006).

Los mecanismos de acción así como la naturaleza de la mayoría de los compuestos liberados por las microalgas aun permanecen poco claros, a pesar del gran potencial que representan los compuestos producidos para la obtención de nuevos fármacos y son escasos los trabajos en los que se ha llegado a realizar la identificación de estos metabolitos con actividad biológica. Sin embargo, se han realizado diferentes estudios en los que se menciona que estos compuestos pueden ser ácidos grasos o derivados de estos como los aldehídos polinsaturados, cinamaldehídos y sus derivados, bromofenoles, brevetoxinas, ácidos orgánicos, péptidos, polisacáridos y alcoholes (Skulber, 2000; Fistarol *et al.*, 2003; Mundt *et al.*, 2003; Barckman *et al.*, 2008; van Rijssel., 2008; Leflaive y Ten-Hage, 2009). En algunos estudios se ha demostrado que las diatomeas son capaces de producir compuestos antibacterianos derivados de ácidos grasos libres y las asterionelinas A, B y C con función de grupo diazotato, el cual es un grupo que presenta isomería con el grup azoxi que se encuentra frecuentemente en antibióticos como la elaiomicina. Otros compuestos interesantes que se han aislado de la diatomea *Nitzschia pungens* son lactonas, las bacillariolidas I y II, las cuales se derivan del cierre del anillo del ácido eicosapentanoico (EPA) en los carbonos 4 y 6 (Shimizu, 1993). Hasta el momento se sabe que los ácidos grasos pueden actuar de forma bactericida o bacteriostática y son utilizados por muchos organismos como mecanismo de defensa contra parásitos y bacterias (Deesbois y Smith, 2010). Los ácidos grasos de cadena corta son capaces de inhibir el crecimiento de *Vibrios* patógenos luminiscentes y su eficiencia es dependiente del pH del medio, necesitando 10 veces más ácidos grasos en incrementos de una unidad de pH (Defoirdt *et al.*, 2007). El grado de actividad antibacteriana está en función de la longitud de la cadena de carbonos y de la presencia, número, posición y orientación de en laces dobles. Por lo regular los ácidos grasos libres insaturados tienden a ser más activos que los saturados, aun cuando cuenten con la misma longitud de la cadena de carbonos. Los enlaces dobles en los ácidos grasos libres insaturados normalmente tienen orientación *cis*, los cuales tienden a presentar una mayor actividad antibacteriana que los que poseen una orientación

*trans*. Esto posiblemente se deba a que la orientación *trans* en los ácidos grasos libre insaturados es similar a la estructura de los ácidos grasos libres saturados, los cuales presentan una menor actividad antibacteriana. Su sitio de acción es la membrana celular, donde interfieren en la cadena de transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa, afectando a la generación de ATP en la célula, impidiendo que alcance los niveles de energía necesarios para sobrevivir e inhibiendo la actividad enzimática. Además, al insertarse en la membrana celular interna de la bacteria, los ácidos grasos insaturados incrementan la fluidez y permeabilidad de la membrana, permitiendo que el contenido celular se libere debido a la lisis celular y ocasione inhibición del crecimiento e inclusive la muerte de la célula. Otros procesos en los que los ácidos grasos libres pueden interferir es en la toma de nutrientes como aminoácidos, al unirse o desplazar a las proteínas transportadoras localizadas en la membrana (Desbois y Smith, 2010). Sin embargo, las bacterias pertenecientes al género *Vibrio* están protegidas por una pared celular, misma que les confiere una cierta resistencia a los ácidos grasos libres. En este sentido es necesario que se realicen más estudios que permitan elucidar el mecanismo de acción antibacteriana en estas especies.

A pesar de lo antes discutido, en los experimentos con *I. galbana* CCMP y en retos con diatomeas como *N. byskanterae* contra *V. alginoliticus* se obtuvieron respuestas inhibitorias a pocos días de iniciar los experimentos, aun cuando las especies de microalgas no alcanzaban su fase estacionaria. Se ha descrito acerca de la capacidad de algunas microalgas como *Fibrocapsa japonica* de inhibir la luminiscencia de *V. fisheri* a bajas densidades celulares, esto es, durante la fase exponencial de crecimiento, cuando las tasas de crecimiento de la microalga son más altas. En este trabajo se afirma que la producción de metabolitos secundarios está regulada por la tasa de crecimiento, por lo que existe la posibilidad que en fases donde la tasa de crecimiento es mayor, la producción de metabolitos secundarios se favorezca (van Rijssel *et al.*, 2008).

En diversos trabajos se ha descrito también que ciertas especies de microalgas son productoras de especies de oxígeno reactivo (EOR) en etapas donde los cultivos se encuentran en fase exponencial, esto es con bajas concentraciones celulares. Estas EOR comprenden moléculas como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radicales como el radical hidroxilo ( $OH$ ) y el anión superóxido ( $O_2^-$ ). Las ROS son agentes oxidantes fuertes, son citotóxicas a través del daño del ADN y la peroxidación de los lípidos, debido a su capacidad de reaccionar con el ion hidroxilo ( $OH$ ), el cual también es altamente reactivo. En las proteínas la oxidación de las cadenas de aminoácidos puede resultar en cambios conformacionales y pérdida de actividad asociada a estos cambios (Marshall *et al.*, 2005, Desbois y Smith, 2010). En este sentido, Marshall *et al.* (2003) afirman que estas EOR juegan un rol como co-factor en la toxicidad de ácidos grasos libres, como el ácido eicosapentanoico (EPA), al encontrar que la toxicidad de este ácido graso se incrementa tres veces en la presencia de superóxido. En un trabajo posterior, encontraron que la presencia de superóxido generado por la xantina oxidasa inhibió la bioluminiscencia de *V. fischeri* y este mismo resultado se observó cuando realizaron una combinación de diferentes concentraciones de EPA y superóxido (Marshall *et al.*, 2005). El trabajo realizado por van Rijssel *et al.* (2008) también sugiere que la actividad de *F. japonica* sobre *V. fischeri* probablemente se deba a un efecto sinérgico entre los ácidos grasos polinsaturados (PUFA`s) y hemolisinas dependientes de la luz indicando que los compuestos involucrados también podrían ser las brevetoxinas y EOR producidas por la especie de microalga, aunque no realizaron la identificación de los compuestos.

Los tiempos de inhibición de cada especie de *Vibrio* utilizada fueron significativamente diferentes, siendo *V. harveyi* la especie que presentó mayor resistencia. Estas diferencias en la respuesta de inhibición pueden ser debido a que el efecto de los diversos compuestos producidos por las microalgas actúan en una forma especie-específico, por lo que cada especie de bacteria puede

presentar una tolerancia diferente a la presencia de un compuesto en particular. Liao *et al.* (2003) afirman que muchos de los extractos salinos de *E. serra* y *P. capillacea* poseen actividad selectiva contra *V. pelagius* y *V. vulnificus*, sin embargo, no encontraron un efecto sobre *V. neresis*. Marques *et al.* (2006) encontraron una mejor protección contra *V. campbellii* y *V. proteolyticus* cuando se utiliza una cepa con buen perfil de ácidos grasos de *Dunaliella tertiolecta* en cultivos de *Artemia*, que cuando se utiliza una cepa con diferente perfil de ácidos grasos de la misma especie de microalga. Esta consideración de especificidad también es mencionada por Sánchez-Saavedra *et al.* (2010) al encontrar diferencias en los radios de inhibición de diversas bacterias patógenas utilizando extractos orgánicos de seis especies de microalgas. Aunado a esto se sabe que los exudados son característicos de las algas que los secretan (Grossart y Simón, 2007), lo cual podría explicar en parte las variaciones en los tiempos de inhibición, aun tratándose de la misma cepa de bacteria.

En general, los cultivos de diatomeas presentaron altas concentraciones de otras especies de bacterias heterotróficas, llegando inclusive a alcanzar cantidades cercanas a  $7 \times 10^7$  UFC/ml, en tanto que los cultivos con *I. galbana* CCMP no sobrepasaron los  $8 \times 10^6$  UFC/ml. Además, la abundancia de bacterias heterotróficas aumentó conforme al tiempo en cada uno de los experimentos, encontrando las mayores densidades en la fase estacionaria. Esta abundancia de bacterias heterotróficas es posible gracias a que en los afloramientos de fitoplancton se producen altas cantidades de materia orgánica particulada (MOP) y disuelta (MOD) así como la lisis de las células de fitoplancton, las cuales son las fuentes de carbono para las bacterias heterótrofas promoviendo su proliferación (Gómez-Gil *et al.*, 2002; Schäfer *et al.*, 2002; Eiler *et al.*, 2007). Se ha demostrado que las bacterias tienen la capacidad de colonizar a las células fitoplanctónicas principalmente cuando se encuentran en etapas senescentes o cuando están formando agregados (Grossart *et al.*, 2006). Adicionalmente la mayoría de las bacterias pelágicas poseen una gran variedad de enzimas hidrolíticas, las cuales

les permiten utilizar de manera eficiente el material orgánico exudado por el fitoplancton (Grossart, 1999).

Existe evidencia que las diatomeas soportan comunidades bacterianas únicas, con marcada diversidad genética inclusive entre diferentes fases de crecimiento. Esto podría tener efecto en el tipo de material orgánico producido por las especies de microalgas, puesto que la liberación de sustancias específicas podría requerir la presencia de una cierta variedad de poblaciones bacterianas para el procesamiento del material orgánico (Shäfer *et al.*, 2002). Las diatomeas producen exopolisacáridos que utilizan para la formación de sus colonias y adhesión a diferentes superficies, los cuales a su vez, pueden servir como sustrato para la proliferación de bacterias (Guerrini *et al.*, 1998; Smith y Underwood, 1998). Comúnmente los polisacáridos extracelulares de las diatomeas están compuestos de ramnosa, fucosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa, siendo estos dos últimos sacáridos los más abundantes (Bruckner *et al.*, 2008). La colonización de superficies por microalgas provee un ambiente enriquecido debido a la disponibilidad de exudados algales, mismo que puede soportar altas tasas de crecimiento bacteriano (Murray *et al.*, 1986).

## Capítulo VII

---

### Conclusiones

---

El crecimiento de las diferentes especies de microalgas utilizadas en esta investigación puede favorecerse o afectarse por la adición de ciertas especies de bacterias.

La adición de bacterias tipo *Vibrio* a los cultivos de *I. galbana* CCMP contribuyó a alcanzar densidades celulares mayores que las densidades encontradas en los cultivos control.

Las especies de microalgas utilizadas en este estudio poseen alta actividad antibacteriana sobre *Vibrio alginolyticus*, *V. campbellii* y *V. harveyi*, siendo *I. galbana* CCMP la especie de microalga que mostró una mayor actividad.

Entre las especies de diatomeas que destacaron por su actividad antimicrobiana contra las especies de *Vibrio* utilizadas se encuentran *N. byskanterae*, *N. incerta* y la cepa 2B.

La inhibición del crecimiento de las especies de bacterias se presentó hasta la fase estacionaria del crecimiento de los cultivos de microalgas. En algunos casos el efecto inhibitorio puede presentarse en la fase exponencial, perdurando hasta la fase estacionaria de los cultivos de microalgas.

La susceptibilidad a los compuestos producidos por las especies de microalgas fue diferente entre especies de bacterias, resultando en tiempos de inhibición distintos para cada especie bacteriana. La especie de bacteria más susceptible a

inhibición fue *V. alginolyticus*, mientras que la especie más resistente a la inhibición fue *V. harveyi*.

Los cultivos de las especies de microalgas soportaron altas densidades de bacterias heterotróficas, indicando un efecto selectivo de los compuestos antibacterianos sobre especies del género *Vibrio*.

## Capítulo VIII

---

### Recomendaciones

---

Es necesario llevar a cabo la caracterización e identificación del compuesto que posee actividad antibacteriana, mediante técnicas cromatográficas como la Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC por sus siglas en inglés) o cromatografía de gases, y realizar estudios que permitan elucidar el mecanismo de acción y toxicidad del compuesto de interés.

Aumentar la cantidad de especies de bacterias a utilizar en los ensayos, para conocer el espectro de inhibición del compuesto producido.

Se recomienda realizar experimentos utilizando la alternativa de aguas verdes con las especies de microalgas y bacterias utilizadas en este estudio, con la finalidad de corroborar la eficiencia del compuesto producido *in vivo* por las especies de microalgas para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas en cultivos de diferentes organismos de importancia acuícola.

## Capítulo IX

---

### Literatura citada

---

Aguilar-May, B. 2002. Remoción de nutrientes con microalgas marinas en un medio equivalente al efluente promedio de una granja camaronícola. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Ensenada, Baja California, México. 104 pp.

Álvarez, J.D., Austin, B., Álvarez, A.M. y Reyes, H. 1998. *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela. *Journal of Fish Disease* 21:313-316.

Anguiano-Beltrán, C. 1996. Patogenicidad de *Vibrio alginolyticus* sobre larvas del mejillón europeo *Mytilus galloprovincialis* y larvas y poslarvas de abulón rojo *Haliotis rufescens*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 47 pp.

Austin, B. y Day, J.G. 1990. Inhibition of prawn pathogenic *Vibrio* spp. by a commercial spray-dried preparation of *Tetraselmis suecica*. *Aquaculture* 90: 389-392.

Avedaño-Herrera, R., Lody, M., y Riquelme, C. 2005. Producción de sustancias inhibitorias entre bacterias de biopelículas en substratos marinos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 40(2):117-125.

Ávila-Villa, L.A., Martínez-Porchas, M., Gollas-Galván, T., López-Elías, J.A., Mercado, L., Murguía-López, A., Mendoza-Cano, F. y Hernández-López, J. 2011. Evaluation of different microalga species and *Artemia (Artemia franciscana)* as possible vectors of necrotizing hepatopancreatitis bacteria. *Aquaculture* 318:273-276

Baker, K.H y Herson, D.S. 1978. Interactions between the diatom *Thalassiosira pseudonanna* and associated pseudomonas in mariculture systems. *Applied and Environmental Microbiology* 35(4):791-796.

Brackman, G., Defoirdt, T., Miyamoto, C., Bossier, P., Van Calenberg, S., Nelis, H. y Coenye, T. 2008. Cinnamaldehyde and cinnamaldehyde derivatives reduce virulence in *Vibrio* spp. by decreasing the DNA-binding activity of the quorum sensing response regulator LuxR. *BMC Microbiology* 8:149.

Bradford, A.K., Cheryl, A.B. y Joy G.W. 1994. Isolation and identification of *Vibrio cholerae* O1 from fecal specimens. En: Wachsmuth, I.K., Blake, P.A. y Olsvic, O. (ed.). *Vibrio cholera* and *Cholera*. American Society for Microbiology. 465 pp.

Bruce, D.L., y Duff, D.C.B. 1967. The identification of two antibacterial products of the marine planktonic alga *Isochrysis galbana*. *Journal of Genetic Microbiology* 48:293-298.

Bruckner, C.G., Bahulikar, R., Rahalkar, M., Schink, B. y Kroth, P.G. 2008. Bacteria associated with benthic diatoms from Lake Constance: Phylogeny and influences on diatom growth and secretion of extracellular polymeric substances. *Applied and Environmental Microbiology* 74(24):7740-7749.

Bruhn, J.B., Dalsgaard, I., Nielsen, K.F., Buchholtz, C., Larsen, J.L. y Gram, L. 2005. Quorum sensing signal molecules (acylated homoserine lactones) in Gram-negative fish pathogenic bacteria. *Diseases of Aquatic Organisms* 65:43-52.

Center for Disease Control Rebuttal. 1999. National Aquaculture Association and Antibiotic use in aquaculture. Memorandum. 20 pp.

Cole, J.J. 1982. Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annual Reviews Ecology Systems* 13:291-314.

Correa-Reyes, J.G. 2001. Selección de especies de diatomeas bentónicas para el cultivo de abulón. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Ensenada, Baja California, México. 142 pp.

Croft, M.T., Lawrence, A.D., Raux-Deery, E., Warren, J.M y Smith, A.G. 2005. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* 438:90-93.

De Lara-Isassi, G. 1991. Propiedades antibióticas de algunas especies de algas marinas bentónicas. *Hidrobiológica* 1(2):21-28.

Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P. y Verstraete, W. 2004. Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture* 240:69-88.

Defoirdt, T., Crab, R., Wood, T.K., Sorgeloos, P., Verstraete, W. y Bossier, P. 2006. Quorum sensing-disrupting brominated furanones protect the gnotobiotic brine shrimp *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii* and *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 72(9): 6419-6423.

Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W. y Bossier, P. 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnology* 25(10): 472-479.

Desbois, A.P., Mearns-Spragg, A. y Smith, V. 2009. A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus*. *Marine Biotechnology* 11:45-52.

Desbois, A.P. y Smith, V.J. 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85:1629-1642.

Eiler, A., Gonzalez-Rey, C., Allen, S. y Bertilsson, S. 2007. Growth response of *Vibrio cholerae* and other *Vibrio* spp. to cyanobacterial dissolved organic matter and temperature in brackish water. *Federation of European Microbiological Societies* 60:411-418.

Fistarol, G.O., Legrand, C. y Granéli, E. 2003. Allelopathic effect of *Prymnesium parvum* on a natural plankton community. *Marine Ecology Progress Series* 255:115-125.

Fistarol, G.O., Legrand, C., Selander, E., Hummert, C., Stolte, W. y Granéli, E. 2004. Allelopathy in *Alexandrium* spp.: effect on a natural plankton community and on algal monocultures. *Aquatic Microbial Ecology* 35:45-56.

Fogg, G.E. y Thake, B.J. 1978. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. University of Wisconsin Press, London. 269 pp.

Fukami, K., Nishijima, T. y Ishida Y. 1997. Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. *Hydrobiologia* 358:185-191.

Gómez-Gil, B., A. Roque y Guerra-Flores, A.L. 2000. Enfermedades infecciosas más comunes en México y el impacto de uso de antimicrobianos. En *Camaronicultura y Medio Ambiente* 315-346.

Gómez-Gil B, A. Roque y G. Velasco-Blanco. 2002. Culture of *Vibrio alginolyticus* C7b, a potential probiotic bacterium, with the microalga *Chaetoceros muelleri*. *Aquaculture* 211: 43-48.

Gómez-Gil, B., Soto-Rodríguez, S.A., García-Gasca, A., Roque, A., Vázquez-Juárez, R., Thompson, F. y Swings, J. 2004. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology*. 150: 1769-1777.

Grossart, H.P. 1999. Interactions between marine bacteria and axénica diatoms (*Cylindrotheca fusiformis*, *Nitzschia laevis* and *Thalassiosira weissflogii*) incubated under various conditions in the lab. *Aquatic Microbial Ecology* 19:1-11.

Grossart, H.P., Czub, G. y Simon, M. 2006. Algae-bacteria interactions and their effects on aggregation and organic matter flux in the sea. *Environmental Microbiology* 8(6):1074-1084.

Grossart, H.P. y Simon, M. 2007. Interactions of planktonic algae and bacteria: effects on algal growth and organic matter dynamics. *Aquatic Microbial Ecology* 47:163-176.

Guillard, R.L.L y J.H. Rhyter. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal Microbiology*. 8:229-239.

Guerrini, F., Mazzotti, A., Boni, L. y Pistocchi, R. 1998. Bacterial-algal interactions in polysaccharide production. *Aquatic Microbial Ecology* 15:247-253.

Herrero, M., Ibáñez, E., Cifuentes, A., Reglero, G. y Santoyo, S. 2006. *Dunaliella salina* microalga pressurized liquid extracts as potential antimicrobials. *Journal of Food Protection* 69(10): 2471-2477.

Huervana, F., De la Cruz, J. y Caipang, C.M. 2006. Inhibition of luminous *Vibrio harveyi* by “green water” obtained from tank culture of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Acta Ichthyologica et Piscatorial* 36:17-23.

Hulot, F.D. y Huisman, J. 2004. Allelopathic interactions between phytoplankton species: The roles of heterotrophic bacteria and mixing intensity. *Limnology and Oceanography* 49 (4):1424-1434.

Jayasree, L., Janakiram, P. y Madhavi, R. 2006. Characterization of *Vibrio* spp. Associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). *Journal of the World Aquaculture Society* 37 (4): 523-532.

Jiménez, J.G., Gelabert, R., y Brito, R. 2006. Efectos tóxicos del níquel y el zinc en *Artemia franciscana* (Crustácea:Branchiopoda: Anostraca). *Universidad y Ciencia* 22: 65-74.

Karunasagar, I., Shivu, M.M., Girisha, S.K., Krohne, G. y Karunasagar, I. 2007. Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. *Aquaculture* 268: 288-292.

Kellam, S.J., y Walker, J.M. 1989. Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture. *British Phycological Journal* 24: 191-194.

Leflaive, J. y Ten-Hage, L. 2009. Chemical interactions in diatoms: role of polyunsaturated aldehydes and precursors. *New Phytologist* 184:794-805.

Liao, W.R., Lin, J.Y., Shieh, W.Y. y Jeng, W.L. 2003. Antibiotic activity of lecithins from marine algae against marine vibrios. *Journal Indian Microbiology Biotechnology* 30: 433-439.

Lio-Po, G.D., Leño, E.M., Peñaranda, M. M., Villa-Franco, A., Sombito, C.D. y Guanzon, N.G. 2005. Anti-luminous *Vibrio* factors associated with the “green water” grow-out culture of the tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 250:1-7.

Lizárraga-Partida, M.L., Anguiano-Beltrán, C., Searcy-Bernal, R., y Vázquez-Moreno, E. 1998. Bacterial water quality in abalone farms of Baja California. *Journal of Shellfish Research* 17 (3): 689-692.

López-Alonso, D., Segura del Castillo, C., García-Sánchez, J.L., Sánchez-Pérez, J.A. y García-Camacho, F. 1994. Quantitative genetics of fatty acid variation in *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) and *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 30:553-558.

Maeda, M., Nogami K., Kanematsu, M., y Kazutsugu, H. 1997. The concept of biological control methods in aquaculture. *Hydrobiología* 358:285-290.

Maestrini, S. Y. y Bonin, D.J. 1981. Allelopathic relationships between phytoplankton species. En: Platt, T. (ed.). *Physiological bases of phytoplankton ecology*. Canadian Bulletin Fisheries and Aquatic Sciences 210: 346 pp

Makridis, P., Alves Costa, R. y Dinis, M.T. 2006. Microbial conditions and antimicrobial activity in cultures of two microalga species, *Tetraselmis chuii* and *Chlorella minutissima*, and effect on bacterial load of enriched *Artemia* metanauplii. *Aquaculture* 255:76-81.

Marques, A., Huynh Thanh, T., Sorgeloos, P. y Bossier, P. 2006. Use of microalgae and bacteria to enhance protection of gnotobiotic *Artemia* against different pathogens. *Aquaculture* 258:116-126.

Marshall, J.A., Nicols, P.D., Hamilton, B., Lewis, R.J. y Hallegraeff, G.M. 2003. Ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) to damselfish (*Acanthochromis polycanthus*): the synergistic role of reactive oxygen species and free fatty acids. *Harmful Algae* 2: 273-281.

Marshall, J.A., Ross, T., Pyecroft, S. y Hallegraeff, G. 2005. Superoxide production by marine microalgae. *Marine Biology* 147:541-549.

Moriarty, J.W.D. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. *Microbial interactions in aquaculture*. En: Bell, C.R., Brylinsky, M. y Jhonson-Green P. (eds.). *Microbial Byosistemas: New Frontiers*. Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax. 1-7 pp.

Mundt, S., Kreitlow, S. y Jansen, R. 2003. Fatty acids with antibacterial activity from the cyanobacterium *Oscillatoria redekey* HUB 051. *Journal of Applied Phycology* 15:263-267.

Murray, R., Cooksey, K.E. y Priscu, J.C. 1986. Stimulation of bacterial DNA synthesis by algal exudates in attached algal-bacterial consortia. *Applied and Environmental Microbiology* 52(5):1177-1182.

Nagayama, K., Iwamura, Y., Shibata, T., Hirayama, I., y Nakamura, T. 2002. Bactericidal activity of phlorotannins from the Brown alga *Ecklonia kurome*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50:889-893.

Nakai, T. y Park, S.C. 2002. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Research in Microbiology* 153:13-18.

Naviner, M., Bergé, J.P., Durand, P., y Le Bris, H. 1999. Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. *Aquaculture* 174: 15-24.

Negrete-Redondo, P., Monroy-Dosta, C. y Romero-Jarero, J. 2008. Evaluación de la calidad bacteriológica del alimento vivo (*Artemia*, *Daphnia*, *Tenebrio* y *Tubifex*) para peces en los sitios de su recolección, producción y venta. *Veterinaria México* 39 (3): 255-268.

Noriega-Orozco, L., Acedo-Félix, E., Higuera-Ciapara, I., Jiménez-Flores, R. y Cano, R. 2007. Pathogenic and non pathogenic *Vibrio* species in aquaculture shrimp ponds. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 49: 60-67.

Olsen A.I., Olsen, Y., Attramadal, Y., Christie, K., Birbeck, T.H., Skjermo, J. y Vadstein, O. 2000. Effects of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile *Artemia franciscana*. *Aquaculture* 190: 11-25

Park, Y., Je, K.-W., Lee, K., Jung, S.-E. y Choi, T.-J. 2008. Growth promotion of *Chlorella ellipsoidea* by co-inoculation with *Brevundimonas* sp. isolated from the microalga. *Hidrobiologia* 598:219-228.

Paul J.V., Arthur K.E., Ritson-Williams R., Ross C. y Sharp C. 2007. Chemical defenses: From Compound to communities. *Marine Biological Laboratory* 213: 226-251.

Pesando, D. 1990. Antibacterial and antifungal activities of marine algae. En: Akatsuka, (ed.). *Introduction to Applied Phycology*. SPB Academic Publishing. Netherlands 3-26 pp.

Pratt, R.H., Mautner, H., Gardner, G.M., Sha, Y. y Dufrenoy, J. 1951. Report on the antibiotic activity of seaweed extracts. *Journal of American Pharmacology Association*. Edición Científica 40: 575-579.

Rico- Mora, R., Voltolina, D. y Villaescusa-Celaya, J.A. 1998. Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) cultures. *Aquacultural Engineering* 19:1-6.

Riquelme, C. y Avedaño, R. 1999. Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae. *Aquaculture Research* 30: 893-900.

Riquelme, C.E., y Avedaño-Herrera, R.E. 2003. Interacción bacteria microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural* 76: 725-736.

Robertson, P.A.W., Calderon, J., Carrera, L., Stark, J.R., Zherdmant, M. y Austin, B. 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Disease Aquatic Organisms* 32: 151-155.

Sánchez-Saavedra, M., Licea-Navarro, A. y Bernáldez-Sarabia, J. 2010. Evaluation of the antibacterial activity of different species of phytoplankton. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 45(3):531-536.

Salvesen, I., Reitan, A.I., Skjermo, J. y Oie, G. 2000. Microbial environments in marine larviculture: impacts of algal growth rates on the bacterial load in six microalgae. *Aquaculture International* 8: 275-287.

Sayegh, F. A.Q., Radi, N. y Montagnes, D.J.S. 2007. Do strain differences in microalgae alter their relative quality as a food for the rotifer *Brachionus plicatilis*?. *Aquaculture* 273:665-678.

Schäfer, H., Abbas, B., Witte, H. y Muyzer, G. 2002. Genetic diversity of "satellite" bacteria present in cultures of marine diatoms. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology* 42:25-35.

Shirahama, K. 1942. On the unsaponifiable matter and phosphatides in marine algae fat. *Journal of the Faculty of Agriculture. Hokkaido University*. 49:1-93.

Shimizu, Y. 1993. Microalgal metabolites. *Chemical Reviews* 93(5): 1685-1698.

Shimizu, Y. 2003. Microalgal metabolites. *Current Opinion in Microbiology* 6: 236-243.

Skulber, O.M. 2000. Micorlagae as source of bioactive molecules- experience from cyanophyte research. *Journal of Applied Phycology* 12:341-348.

Smith, D.J. y Underwood, G.J.C. 1998. Exopolymer production by intertidal epipellic diatoms. *Limnology and Oceanography* 43(7): 1578-1591.

Soto-Rodríguez, S.A. 2002. Estudio de los mecanismos de patogenicidad de bacterias luminiscentes en larvas de camarón. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 272 pp.

Soto-Rodríguez, S.A., Roque, A., Lizárraga-Partida, M.L., Guerra-Flores, A.L. y Gómez-Gil, B. 2003. Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii. *Disease Aquatic Organism*. 53: 231-240.

Soto-Rodríguez, S.A., Simoes, N., Roque A., y Gómez-Gil. 2006. Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios. *Aquaculture* 258: 109-115.

Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1979. *Biometría: Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. H. Blume Ediciones. Madrid, España. 832 pp.

Suga, H. y Smith, K.M. 2003. Molecular mechanism of bacterial quorum sensing as a new drug target. *Current Opinion in Chemical Biology* 7:586-591.

Tendencia, E.A., y de la Peña, M. 2003. Investigation of some component of green water system which makes it effective in the initial control of luminous bacteria. *Aquaculture* 218: 115-119.

Terekhova, V.E., Aizdaicher, N.A., Buzoleva, L.S. y Somov, G.P. 2009. Influence of marine microalgae on the reproduction of the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Russian Journal of Marine Biology* 35(4).355-358.

Thillairajasekar, K., Duraipandiyan, V., Perrumal, P. y Ignacimuthu, S. 2009. Antimicrobial activity of *Trichodesmium erythraeum* (Ehr) (microalgae) from South

East coast of Tamil Nadu, India. *International Journal of Integrative Biology* 5(3): 167-170.

Thompson, F.L., Iida, T. y Swings, J. 2004. Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68(3):403-431.

Tinh, N.T.N., Dierckens, K., Sorgeloos, P. y Bossier, P. 2008. A review of the functionality of probióticas in the larviculture food chain. *Marine Biotechnology* 10:1-12.

Trujillo, T., Aguirre-Guzmán, G., Sánchez, J.G., y Rábago-Castro, J. 2005. Patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio* sp. en juveniles de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Ciencia y Mar* 27: 11-18.

Van Rijssel, M., de Boer, M.K., Tyl, M.R. y Gieskes, W.W.C. 2008. Evidence for inhibition of bacterial luminescence by allelochemicals from *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae), and the role of light and microalgal growth rate. *Hidrobiologia* 596:289-299.

Venkateswara Rao, A. 2009. Vibriosis en acuicultura del camarón. [en línea] <http://www.bioaqualperu.com/VIBRIOSIS%20EN%20LA%20ACUICULTURA%20DEL%20CAMAR%C3%93N.doc.pdf> Fecha de consulta: 25 de junio de 2010.

Villamil, L., Figueras, A., Planas, M. y Novoa, B. 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture* 219: 43-56.

Vinod, M.G., Shivu, M.M., Umesha, R., Rajeeva, B.C., Krohne, G., Karunasagar, I. y Karunasagar, I. 2006. Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with potencial for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture* 255: 117-124.

Viso, A.C., Pesando, D. y Baby, C. 1987. Antibacterial and antifungal properties of some marine diatoms in culture. *Botanica Marina* 30:41:45.

Wikfors, G.H., y Patterson, G.W. 1994. Differences in strains of *Isochrysis* of importance to mariculture. *Aquaculture* 123: 127-135.

Zar, J.H. 1984. Bioestatistical Analysis. Prentice-Hall, Inc. London, 718 pp.

## Capítulo X

---

## Anexos

---

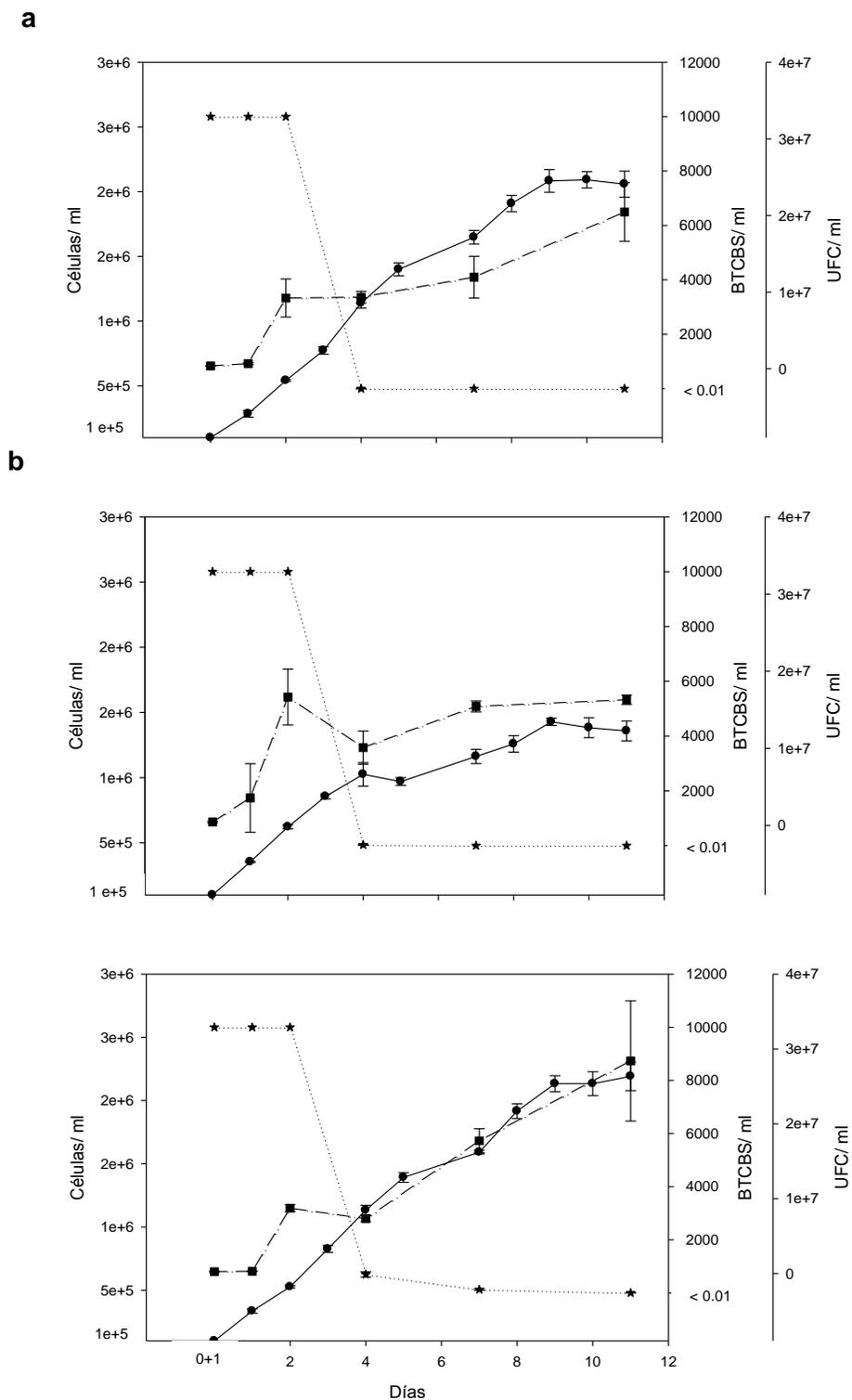


Figura 13.- Valores promedio y desviación estándar de la densidad de **a:** *V. alginolyticus*; **b:** *V. campbellii* y **c:** *V. harveyi* (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ ) cultivadas en conjunto con *N. incerta* (●). Filtrado de 10 ml.

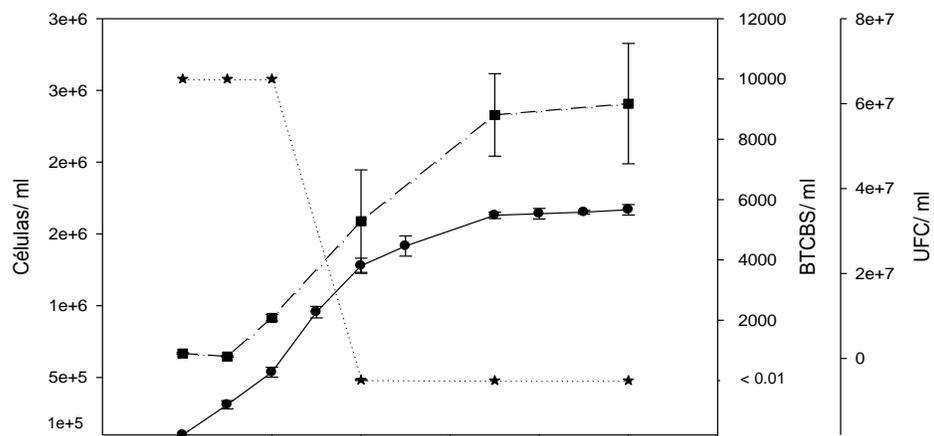
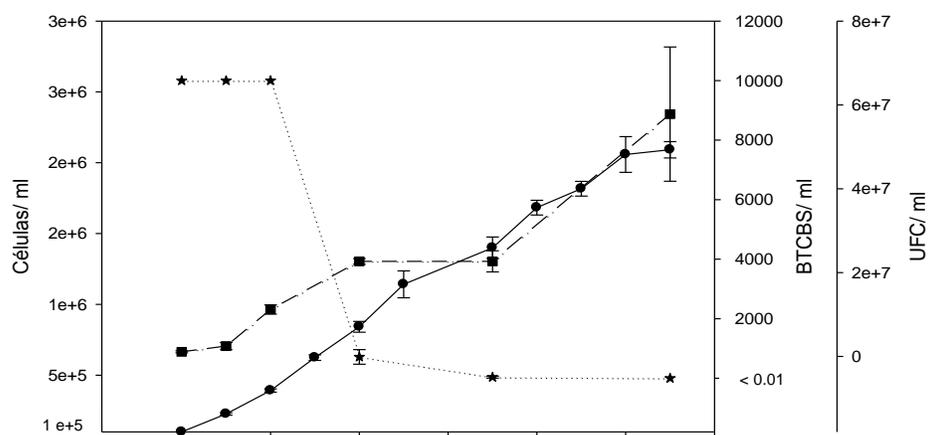
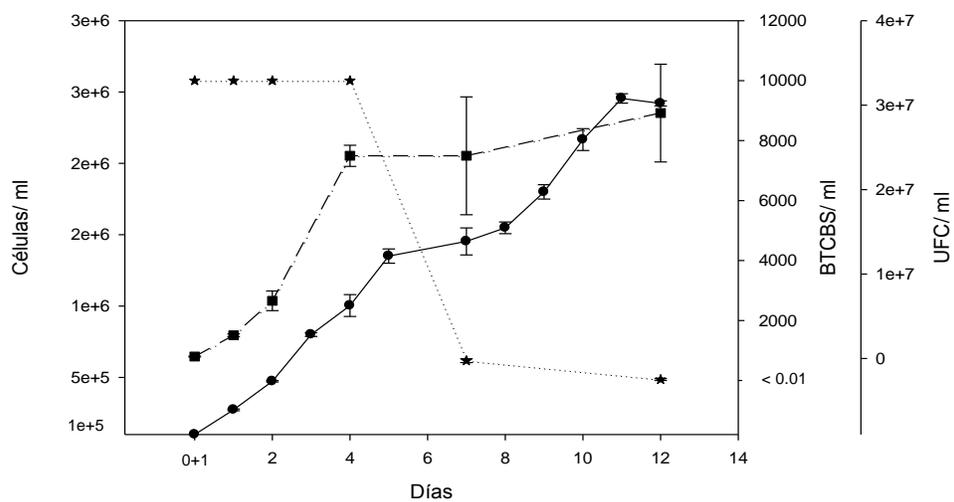
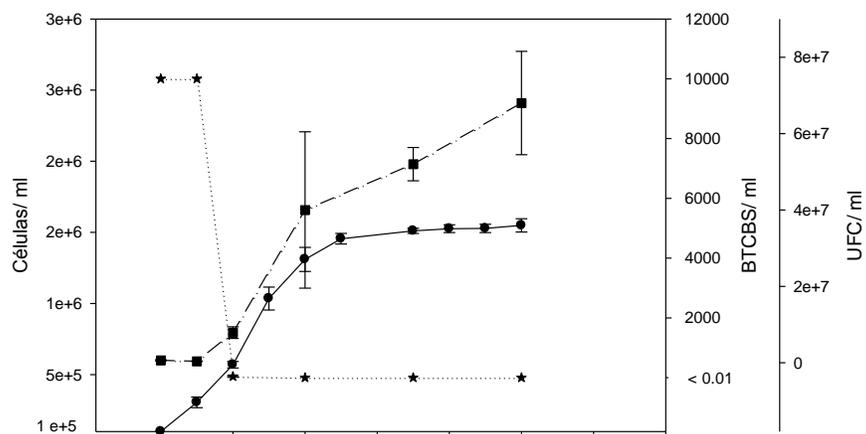
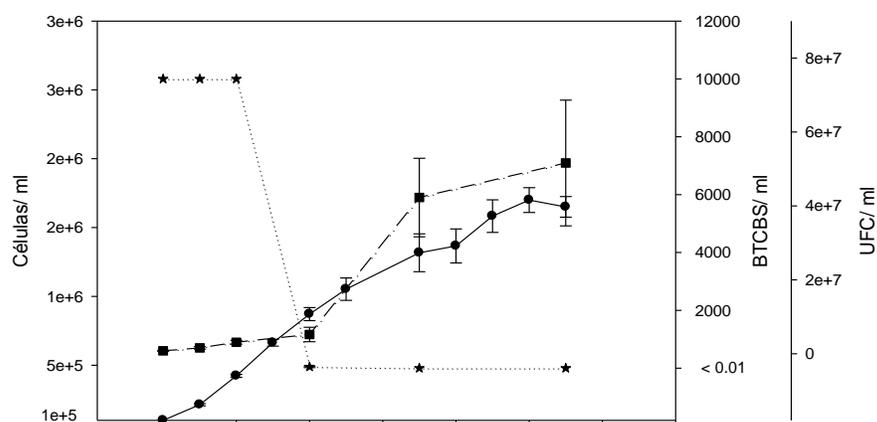
**a****b****c**

Figura 14.- Valores promedio y desviación estándar de la densidad de **a:** *V. alginolyticus*; **b:** *V. campbellii* y **c:** *V. harveyi* (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ ) cultivadas en conjunto con *N. laevis* cepa C (●). Filtrado de 10 ml.

a



b



c

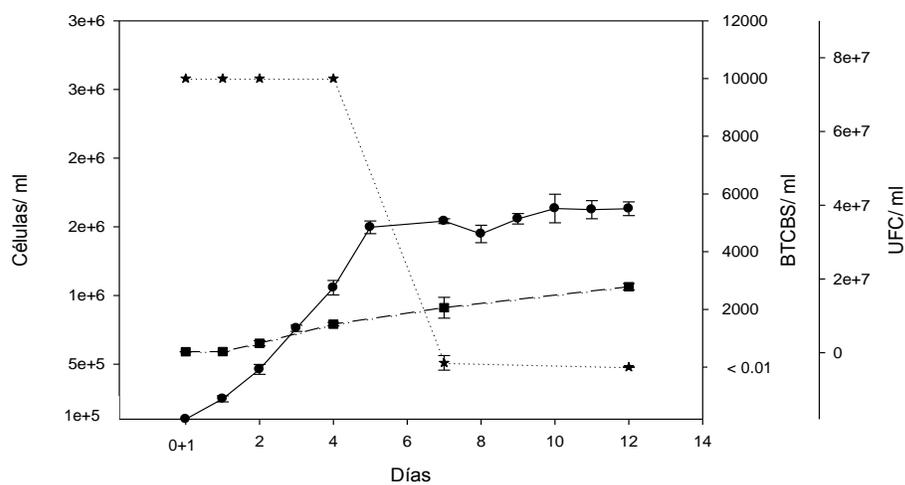
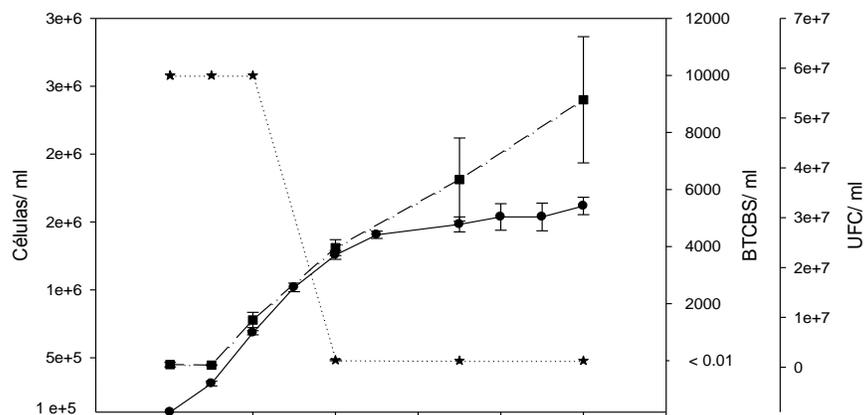
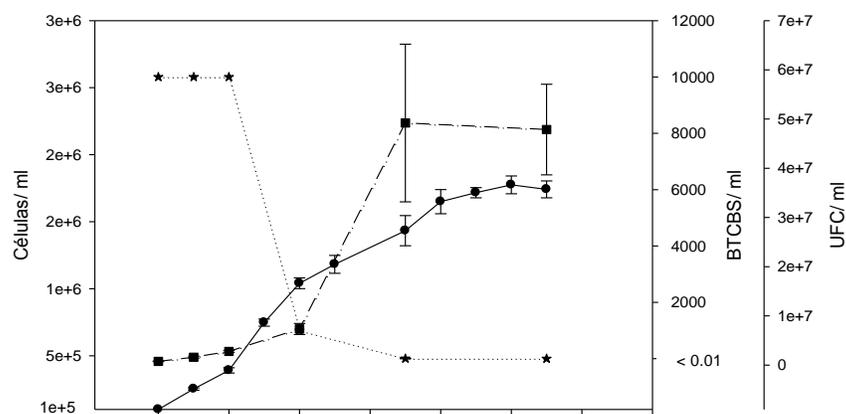


Figura 15.- Valores promedio y desviación estándar de la densidad de **a:** *V. alginolyticus*; **b:** *V. campbellii* y **c:** *V. harveyi* (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ ) cultivadas en conjunto con *N. byskanterae* (●). Filtrado de 10 ml.

a



b



c

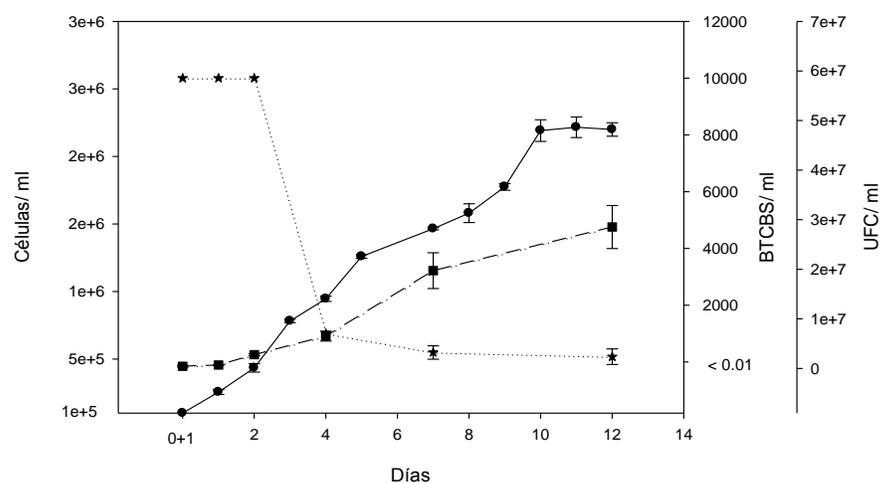
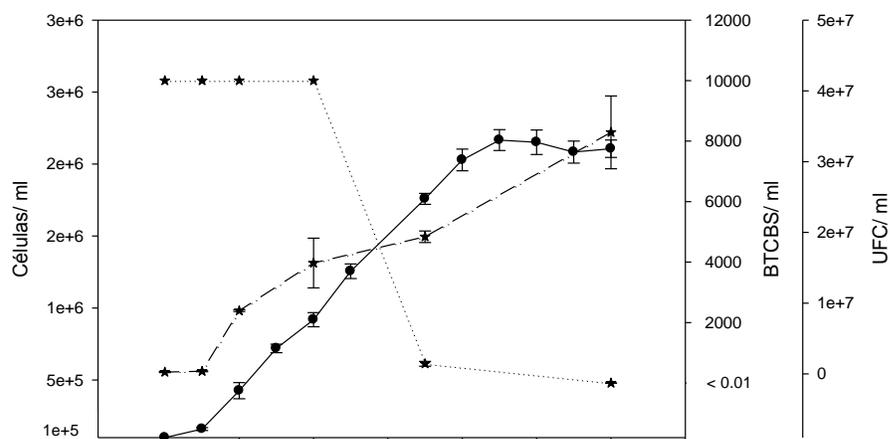
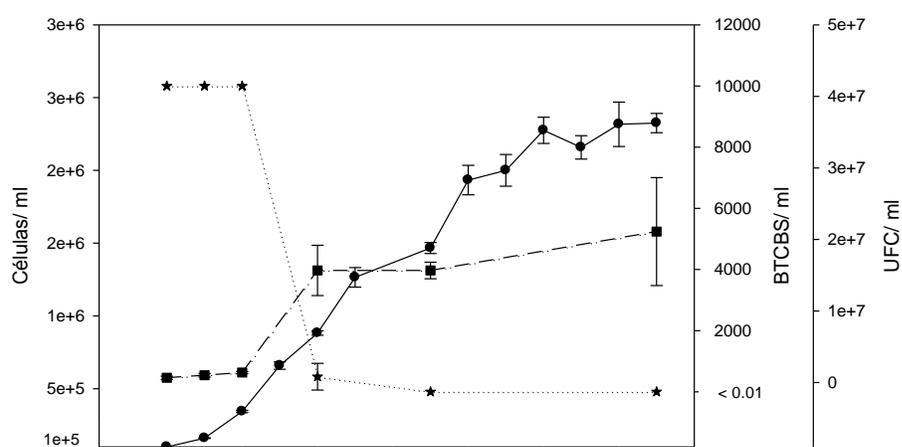


Figura 16.- Valores promedio y desviación estándar de la densidad de **a:** *V. alginolyticus*; **b:** *V. campbellii* y **c:** *V. harveyi* (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ ) cultivadas en conjunto con la cepa 2B (●). Filtrado de 10 ml.

a



b



c

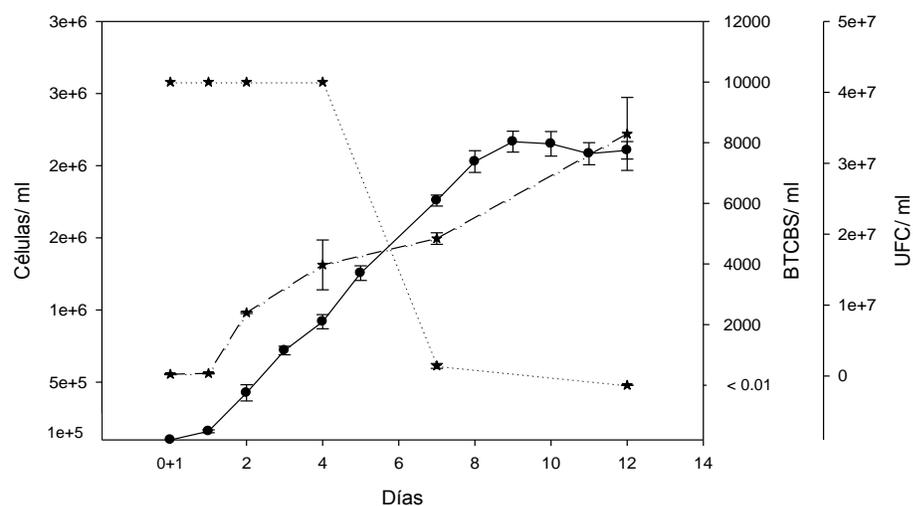


Figura 17.- Valores promedio y desviación estándar de la densidad de **a:** *V. alginolyticus*; **b:** *V. campbellii* y **c:** *V. harveyi* (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ ) cultivadas en conjunto con *N. frustulum* var. *perminuta* (●). Filtrado de 10 ml.

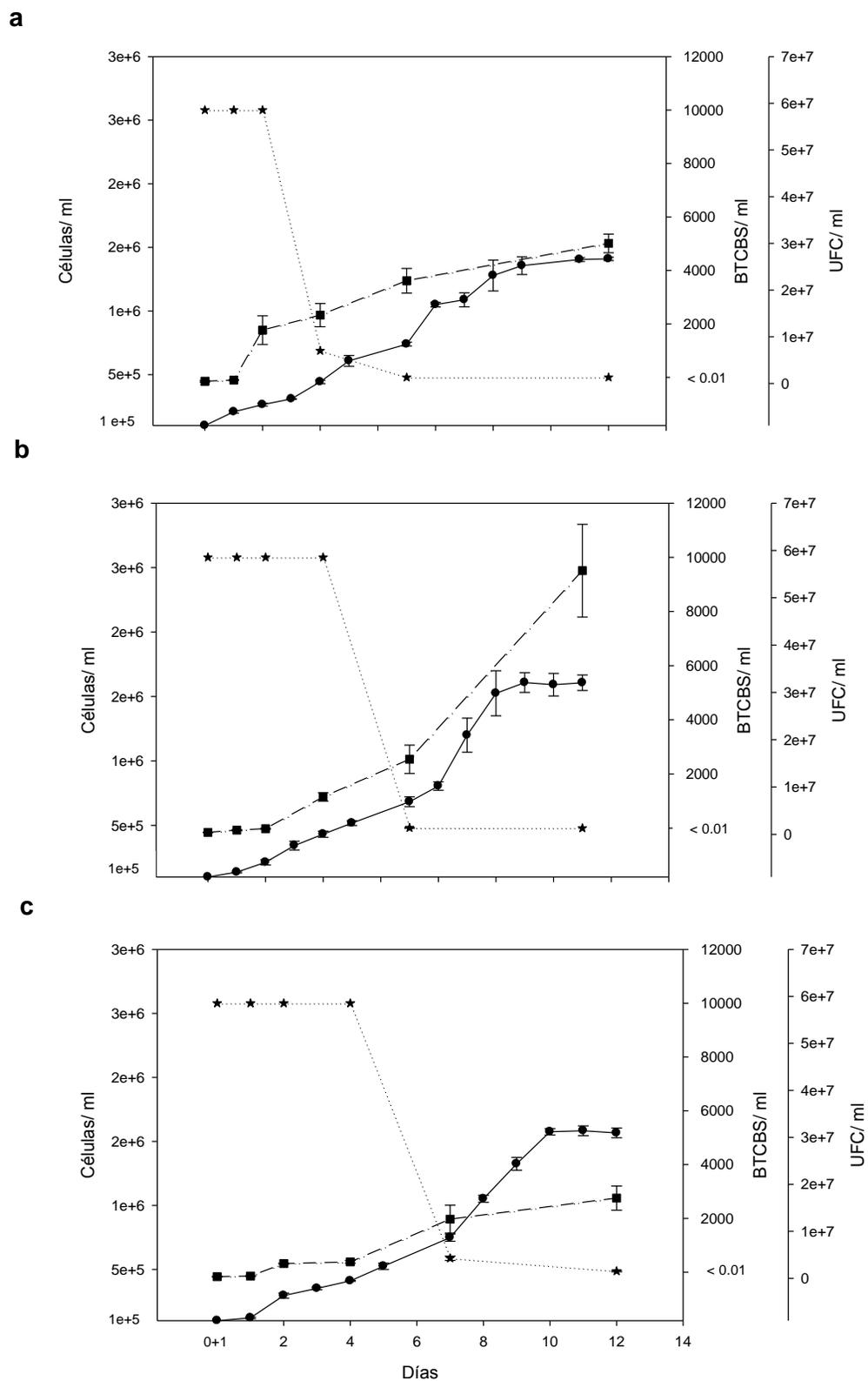


Figura 18.- Valores promedio y desviación estándar de la densidad de **a:** *V. alginolyticus*; **b:** *V. campbellii* y **c:** *V. harveyi* (BTCBS/ml: ★ y bacterias heterotróficas UFC/ml: ■ ) cultivadas en conjunto con la cepa 5B (●). Filtrado de 10 ml.