

# COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL PRODUCIDOS POR LAS MICROALGAS *Nannochloropsis oculata* Y *Porphyridium cruentum*.

## I. INTRODUCCIÓN

La producción de organismos por medio de la acuicultura constituye una de las principales fuentes de alimento y trabajo en los países que se dedican a ésta actividad. A medida que se han desarrollado sistemas intensivos de producción, la incidencia de enfermedades bacterianas y virales se ha incrementado, debido principalmente a que en estos sistemas se cultivan densidades altas creando condiciones de estrés que favorecen el establecimiento de patógenos oportunistas. Algunos patógenos no sólo ocasionan pérdidas económicas, sino igualmente, impactan a poblaciones naturales de organismos acuáticos, así como a la salud humana (De Kikenlin et al., 1985).

Entre los patógenos más importantes en la acuicultura están las bacterias ya que, gracias a su corta vida, la población se desarrolla rápidamente pudiendo infectar a cuanto hospedero susceptible coexista en el ambiente (Sindermann, 1990a), un ejemplo son las bacterias gram negativo como las pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Pasteurella*, algunas especies de estos géneros causan, en larvas de peces, moluscos y crustáceos, enfermedades tales como septicemia hemorrágica y la enfermedad de la aleta rota en peces. Estas bacterias pueden infectar a través de las branquias, tracto digestivo, lesiones expuestas y posteriormente se observan signos como enrojecimiento de las aletas

y piel, hemorragias viscerales, reducción de la actividad y la muerte. Para bivalvos y crustáceos la enfermedad de la vibriosis es una de las más dañinas, en bivalvos causa erosión progresiva en el manto, deformación, daño velar, atrofia y lesiones viscerales progresivas; mientras que en crustáceos presenta puntos cafés en las branquias, en el órgano linfoide, y músculos abdominales (Sindermann, 1990b). La vibriosis está asociada a grandes mortalidades y a grandes pérdidas económicas en la industria de la acuicultura en todo el mundo (Gay et al., 2003).

Las bacterias *Vibrio harveyi* y *Vibrio splendidus* han sido asociadas a grandes mortalidades del cultivo de varias especies del género *Haliotis* en Tasmania (Bower, 2003), de *Sparus aurata* en granjas en el Mediterráneo (Pujalte et al., 2003), de *Colistium nudipinnis* y *Colistium guntheri* en Nueva Zelanda (Diggles et al., 2000), en larvas de *Scophthalmus maximus* (Thompson et al., 2005), de *Ruditapes decussatus* en España durante el periodo 2001-2002 (Gómez-León et al., 2005) y en juveniles de *Cassostrea gigas* en La Bahía de Morlaix (Francia) (Lacoste et al., 2001); la variedad *V. splendidus* II es la causante de necrosis en larvas de *Cassostrea gigas* (Sugumar et al., 1998).

*Aeromonas hydrophila* ocasiona la enfermedad de “aletas rojas”, una de las principales causas de muerte en cultivos de peces de agua dulce, en peces marinos como en *Trachinotus carollinus*, en *Morone saxatilis* (Hawke, 1976) y en *Gadus morhua* (Jensen y Larsen, 1979). Esta bacteria es la causante de úlceras en *Carassius auratus* (Moti et al., 2005) y en *Scophthalmus maximus* (Wen-hui y

Jie 2005), de septicemia en *Oncorhynchus mykiss* (Fuentes y Pérez, 1998). Vásquez-Yeomans y colaboradores (2004), aislaron *Aeromonas hydrophila* del cultivo de *Cassostrea gigas* en Bahía Falsa, Baja California México. Por otro lado, Costa y Rossi (2002), asociaron a esta bacteria como un factor de riesgo a los consumidores de aves de corral, también ha estado relacionado con casos de abortos en ganado ovino (Ilhan et al, 2006) y con algunas infecciones en humanos (Sevillano et al., 1990).

Existen diferentes tratamientos para estas enfermedades, pero en la producción acuícola, el tratamiento más practicado para el manejo de poblaciones bacterianas patógenas es el uso de antibióticos; sin embargo, su uso inadecuado ha creado resistencia entre las bacterias, por lo cual se ha buscado alternativas de control de enfermedades, destacando la prevención. Bajo este principio y aprovechando los mecanismos de exclusión competitiva, ha surgido el uso de microorganismos benéficos, llamados probióticos, como control biológico en la prevención de ataques bacterianos (Balcázar, 2002).

Gracias a estas nuevas alternativas, ha existido la necesidad de descubrir moléculas con propiedades antibacterianas, como sucedió en la década de los 60's, la cual se caracterizó por la búsqueda de compuestos antibióticos de origen marino, principalmente en los metabolitos secundarios de las microalgas y de invertebrados (Faulkner, 1995). Dentro de los antibióticos producidos por las microalgas encontramos ácidos grasos, sustancias fenólicas como: bromofenoles,

taninos, terpenoides, polisacáridos y otros carbohidratos, alcoholes glicolípidos, péptidos y enzimas inhibidoras.

- Los ácidos grasos son componentes comunes y no son considerados tóxicos, sin embargo, en organismos marinos se ha observado actividad antibacterial debido a sus fuertes propiedades (Duff et al., 1966).
- Bromofenoles: los halógenos contienen fenoles que se sabe que funcionan como antisépticos y desinfectantes, por lo tanto presentan actividad antibacterial (Bernald et al., 1972, Duff et al., 1966).
- Terpenoides: se ha observado que inhiben el crecimiento de bacterias y de hongos (Bernald et al., 1972).
- Floroglucinol y taninos: presentan actividad antibacterial y coagulación de proteínas (Bernald et al., 1972).
- Otros antibióticos: acetonas alogenadas y butonas, estas cetonas son fuertemente inhibidoras en el crecimiento de bacterias de los géneros *Staphylococcus* y *Vibrio* (Channell et al., 1988, Hashimoto, 1979).

Estos compuestos se han encontrado en diferentes grupos de microalgas principalmente en las Cianobacterias (Tabla I), Diatomeas (Tabla II), Clorofitas (Tabla III) y en menor proporción en otras especies (Tabla IV).

En el grupo de las cianofitas, especies del género *Anabaena* (Moore et al., 1986), *Scytonema* sp. (Ishibashi et al., 1986), *Nostoc* (Bloor y England, 1989) y *Arthrospira platenses* (Ayehunie et al., 1998); también se han reportado como productoras de sustancias antivirales. En general alrededor del 2% de extractos de cianobacterias inhiben la trascrición del virus de la inmunodeficiencia adquirida tipo I (Lau et al., 1993). Como antifungicidas, se ha reportado que *Calothrix* sp., inhibe a *Macrophomina phaseolina* (hongo que causa la enfermedad en las semillas del maíz y el sorgo) (Mahakhant et al., 1998).

Dentro de este mismo grupo de microalgas se ha demostrado que algunas especies tienen compuestos con actividad antibacterial, tanto para bacterias gram positivas como para gram negativas. Por ejemplo *Desmococcus*, *Scenedesmus* (Ördög et al., 2004), *Synechococcus* y *Synechocystis*, producen sustancias que afectan el crecimiento de *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae* (Mezrioui et al., 1994). También se les conocen atributos como potenciales post-sinapsis gracias a las anatoxinas generadas por *Anabaena flosaquae* (Carmichael, 1992), como complemento alimenticio *Spirulina* sp. (Kato, 1991) y como terapéuticos (Belay et al., 1993, Iwata et al., 1990).

Tabla I. Compuestos con actividad antibacteriana de las Cyanophytas.

| <b>Microalga</b>           | <b>Compuesto</b>       | <b>Referencia</b>              |
|----------------------------|------------------------|--------------------------------|
| <i>Fischerella ambigua</i> | Ambigol A, tjipanazole | Falch y colaboradores 1992)    |
|                            | Kawaguchipectina B     | Ishida y colaboradores (1997)  |
| <i>Nostoc muscorum</i>     | Compuestos fenolíticos | De Cano y colaboradores (1990) |
| <i>Scytonema</i> sp.       | Scytonemina A          | Helms y colaboradores (1988)   |

En el grupo de las diatoma se le conoce a *Nitzshia pungens* var. *multiseries* por producir ácido domóico que ayuda a evitar la neurodegeneración, así como una de las especies causantes de mareas rojas (Laycock et al., 1989). *Skeletonaema costatum* tiene compuestos activos derivados de ácidos grasos poliinsaturados con actividad probada en *Vibrio anguillarum* (Berge et al., 1997). Halimecina A; es producida por la misma microalga mostrando actividad antibacterial (Chen et al., 1996).

Tabla II. Principales compuestos con actividad antibacteriana producidos por las Bacilliarophytas.

| <b>Microalga</b>                             | <b>Compuesto</b>              | <b>Referencia</b>             |
|--|-------------------------------|-------------------------------|
| <i>Asterionella japonica</i>                 | Ácidos grasos                 | Pesando (1972)                |
| <i>Bacteriastrium elegans</i>                | Ácidos grasos                 | Aubert y colaboradores (1979) |
| <i>Chaetoceros sociales</i>                  | Ácidos grasos                 | Aubert y colaboradores (1979) |
| <i>Chaetoceros peruvianus</i>                | Ácidos grasos                 | Aubert y colaboradores (1979) |
| <i>Navicula delognei</i> f. <i>elliptica</i> | Ácidos grasos                 | Findaly y Patil (1984)        |
| <i>Skeletonema costatum</i>                  | Ácidos grasos poliinsaturados | Berge y colaboradores (1997)  |
| <i>Thalassiosira</i> spp.                    | Ácidos grasos                 | Aubert y colaboradores (1979) |

El género *Chlorella* sp. (clorofita) es de los más estudiados debido a que presenta eficacia terapéutica sobre úlceras gástricas (Hasuda y Mito, 1966), constipación, leucopenia (Saito et al., 1966), anemia (Sonoda, 1972), hipertensión (Miyakoshi et al., 1980), diabetes (Fukui, 1979), malnutrición infantil (Tokuyaso, 1983) y neurosis (Sonoda y Okuda, 1978), atribuido a sus componentes nutritivos como vitaminas, fibras minerales y proteínas, previene la arterosclerosis, la hipercolesterolemia por glicolípidos y fosfolípidos, antitumorales por glicoproteínas, péptidos y nucleótidos (Tanaka et al., 1984), antivirales, inhibiendo la replicación del virus causante de la

enfermedad “septicemia hemorrágica viral” que afecta a peces salmónidos (Fábregas et al., 1999) y compuestos antibacterianos afectando el crecimiento de bacterias gram negativas y de bacterias gram positivas (Ördög et al., 2004) como *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* (Mezrioui et al., 1994) y *Bacillus subtilis* (Kim et al., 2001).

Tabla III. Principales compuestos con actividad antibacteriana producidos por las Chlorophytas.

| Microalga                      | Compuesto                 | Referencia                   |
|--------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| <i>Chlorella</i> sp.           | Chlorellina               | Pratt y colaboradores (1944) |
| <i>Chlorococcum</i> sp.        | Acido $\gamma$ -linoléico | Ohta y colaboradores (1995)  |
| <i>Dunaliella primolecta</i>   | Acido $\gamma$ -linoléico | Ohta y colaboradores (1995)  |
| <i>Protosiphon botryoides</i>  | Posibles ácidos grasos    | Harder y Opperman (1953)     |
| <i>Stichococcus bacillaris</i> | Acidos grasos             | Harder y Opperman (1953)     |
| <i>Stichococcus mirabilis</i>  | Posibles ácidos grasos    | Harder y Opperman (1953)     |

Estos compuestos bioactivos, abundan en la fase estacionaria (Borowitzka, 1995), como la presencia de ácido domóico en *Nitzschia pungens* en mayor concentración durante esta fase (Douglas y Bates, 1992).

Sin embargo, no sólo la fase de crecimiento lento es estimulante para la producción de éstos metabolitos, sino también factores ambientales como la limitación de nutrientes, especialmente el nitrógeno (N) y fósforo (P), como se aprecia para *Oscillatoria cautísima* donde su máxima concentración de acutifina se presenta en la fase estacionaria a bajas concentraciones de P y N (Moore et al., 1986). *Nostoc muscorum* y *Scytonema* sp. son afectadas por la limitación del N

y de hierro (Fe), por lo tanto comienzan a secretar biotoxinas (Bloor y England, 1991).

Tabla IV. Principales compuestos con actividad antibacteriana producidos por otras microalgas.

| Microalga                       | Compuesto                    | Referencia                        |
|---------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Chrysophyta</b>              |                              |                                   |
| <i>Coccolithus</i> sp.          | Posible terpeno/carbohidrato | Duff y colaboradores (1966)       |
| <i>Monochrysis</i> sp.          | Posible terpeno/carbohidrato | Duff y colaboradores (1966)       |
| <i>Isochrysis</i> sp.           | Posible terpeno/carbohidrato | Duff y colaboradores (1966)       |
| <i>Prymnesium parvum</i>        | Glicolípidos/lipoproteínas   | Paster (1973)                     |
| <b>Haptophyta</b>               |                              |                                   |
| <i>Phaeocystis</i>              | Acido acrílico               | Sieburth (1959)                   |
| <b>Pyrrophyta</b>               |                              |                                   |
| <i>Amphidinium carteri</i>      | Acrolil-colina               | Taylor y colaboradores (1974)     |
| <i>Goniodoma</i> sp.            | Goniodomina                  | Sharma y colaboradores (1968)     |
| <i>Prorocentrum micans</i>      | Terpenos/carbohidratos       | Burkholder y colaboradores (1960) |
| <i>Protogonyulax tamarensis</i> | Terpenos/carbohidratos       | Burkholder y colaboradores (1960) |

Otro de los factores ambientales que afectan la producción de metabolitos es la temperatura, *Nostoc linckia* produce mayor cantidad de sustancias antibacterianas cuando se cultiva a bajas temperaturas (Gromov et al., 1991). Se presenta algo similar con la producción de lípidos en diatomeas, en algunos casos aumentan las concentraciones de ácidos grasos como el ecosapentaenóico (Utkilen y Gjolme, 1992). Antonella y colaboradores (2005), encontraron actividad antibacterial, antiviral y antifúngica a partir de ácidos grasos n-3, principalmente el ácido eicosapentaenóico (20:5 n-3), de 3 microalgas: *Chlorella minutissima*, *Haematococcus pluviales* y *Tetraselmis suecica*.



Además de la importancia de las microalgas, mencionadas anteriormente, se ha incrementado el uso de las microalgas no sólo como alimento de moluscos filtradores, de zooplancton o de larvas de peces, sino también para reducir la mortalidad de los organismos en cultivo y para mantener una buena calidad del agua (cultivo verde) (Cueneyt et al., 2006).

El cultivo verde o “green water”, tiene diferentes ventajas para los organismos de cultivo y en la calidad del agua:

- Realza el contraste visual y la dispersión de la luz: sirve para la detección del alimento en los cultivos, así como el desarrollo de los ojos en las larvas.
- Mejora la nutrición: con la ingestión directa de las microalgas por las larvas o con la deglución de presas vivas como rotíferos y artemia enriquecidas con estas microalgas (Cueneyt et al., 2006).
- Incrementa la eficiencia del sistema inmune de las larvas en cultivo.
- Estabilización de la calidad del agua: haciendo remoción de amonio y producción de O<sub>2</sub> (Izquierdo et al., 2006).
- La producción de metabolitos por las microalgas con actividad antimicrobiana. Por ejemplo Mezrioui y colaboradores (1994), observaron que con la microalga *Chlorella* como cultivo verde reduce la abundancia de *Vibrio cholerae* en estanques para el tratamiento de aguas en Marruecos. El uso de cultivo en agua verde controla el incremento poblacional de *Vibrio harveyi* en cultivos de camarón (Tendencia et al., 2003; Tendencia y Peña, 2003).

Gracias a esta técnica y sus buenos resultados en cuanto a crecimiento y supervivencia de los organismos (Silva, 1998; Skiftesvik et al., 2003; Stottrup et al., 1995), se ha incrementado su uso dentro del área de la acuicultura como por ejemplo, en el cultivo de *Sparus aurata*, donde se observó una supervivencia de aproximadamente 44 % y un peso húmedo de 2.0 mg., para el cultivo donde se utilizaron microalgas, siendo mayor que con el cultivo sin éstas (16 % de supervivencia y 1.1 mg de peso húmedo). Algunos autores, reportaron excelentes resultados utilizando la técnica de cultivo verde para cultivar *Pagrus pagrus*. (Mihelakakis et al., 2001, Papandroulakis et al., 2002). Resultados similares se encontraron en el cultivo de *Paralichthys adspersu* (Silva, 1998). Guner y colaboradores (2004), obtuvieron un desarrollo de *Pagellus erythrinus*, significativamente mayor en cultivo verde con *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis suecica* que en cultivo sin microalgas.

Entre las especies que se han reportado con este propósito está la microalga *N. oculata*, que actualmente se utiliza para mantener la calidad del agua en diferentes cultivos, por ejemplo del cultivo de langosta, ya que aparentemente excretan compuestos que inhiben la actividad de microorganismos patógenos, además, actúan en la remoción de compuestos nitrogenados (Kittaka et al., 2005).

*N. oculata* es una microalga marina que pertenece al grupo de las Eustigmatophyceas las cuales se encuentran en arreglos unicelulares coccoides y la mayoría presentan pirenoides y zooesporas aunque existen algunas especies que carecen de estas estructuras. Son microalgas marinas representativas del picoplancton, no presentan flagelos, poseen un sólo cloroplasto (Van Den Hoek et

al., 1995) y diversos pigmentos como: violaxantina, astaxantina, anteroxantina, vaucheriaxantina, zeaxantina, canthaxantina,  $\beta$ -caroteno y clorofila a (Lubián et al., 2000).

Los estudios principales realizados sobre el género *Nannochloropsis*, tienen como objetivo la extracción de los ácidos grasos poliinsaturados, como el eicosapentaenóico (20:5), ya que es de gran utilidad en la acuicultura como alimento (Sukenik et al., 1989, Sukenik y Carmeli 1990, Brown et al., 1993).

Otra microalga con un fuerte potencial por su producción de compuestos de interés comercial, es la especie *Porphyridium cruentum*; es una microalga marina que pertenece al grupo de las Rhodophytas (algas rojas), sus células son esféricas de 4 a 6  $\mu\text{m}$  de diámetro, no presenta flagelos, contiene ficocianina y ficoeritrina como pigmentos accesorios (Arredondo-Vega et al., 1994), tiene un sólo cloroplasto central y tiene pirenoides (Dermound y Chaumont 1992), no muestra una pared real, en su lugar está rodeada por una membrana compuesta de polisacáridos sulfatados (McCadless y Craigie, 1979).

Se han realizado diversos estudios sobre esta microalga, principalmente encaminados a la producción de ácidos grasos poliinsaturados como son el ácido eicosapentaenóico (20:5) y el ácido araquidónico (20:4), para la producción de polisacáridos de naturaleza sulfatada (que por su viscosidad tiene potencial en la industria alimentaria y farmacéutica), para la producción de pigmentos como la ficoeritrina (utilizado como marcador en inmunoensayos) y para la obtención de enzimas de aplicación terapéutica como la súper óxido dismutasa, ayudando en el tratamiento de células cancerosas (Arredondo-Vega y Vázquez-Duhalt, 1991).

Se ha reportado además, que *P. cruentum* produce un exopolisacárido que evita que *Helicobacter pylori* y *Aeromonas veronii* (bacterias patógenas del humano), *Vibrio campbellii*, *Vibrio ordalii* y *Streptococcus saprophyticus* (bacterias patógenas de peces), se adhieran a las células hospederas (Guzmán-Murillo y Ascencio, 2000). Otros trabajos desarrollados por Talyshinsky y colaboradores (2000), con polisacáridos en *Porphyridium* sp. muestran un gran potencial para la inhibición del retrovirus MuLV (Murine Leukemia Virus) y la transformación celular del virus MuSV-124 (Murine Sarcoma Virus), así como la inhibición de la replicación del virus ASFV (African Swine Fever Virus) y del virus VHSV (Viral Hemorrhagic Septicemia Virus) en salmónidos (Fábregas et al., 1999).

En un estudio realizado por Ginzberg y colaboradores (2000), se encontraron que la adición de biomasa liofilizada de la microalga *Porphyridium* sp., en la dieta de gallinas, reduce la tasa alimenticia en un 10 %. Los huevos de dichas gallinas presentaron niveles menores de colesterol y un incremento en los niveles de ácido linoléico, ácido araquidónico y de carotenoides, con una coloración más oscura con respecto a los huevos de gallinas control (sin adición de la microalga).

Como ya se mencionó anteriormente, las enfermedades que afectan a la industria de la acuicultura originan pérdidas totales o parciales en la producción. Una solución a éstas enfermedades es el uso de antibióticos, que en ocasiones se utiliza de una manera inadecuada, lo cual crea resistencia en los patógenos, afectando a la ecología de los ambientes aledaños al cultivo y afectando a la salud humana, ya que algunos de estos compuestos pueden ser bioacumulables. Por lo

anterior se está intensificando la búsqueda detallada de nuevos compuestos naturales y tratamientos para tales enfermedades. Por lo tanto, el propósito de este trabajo es explorar la posible presencia de compuestos antibacterianos de las microalgas (ya que éstas tienen la capacidad de biosintetizar, metabolizar, acumular y secretar una gran diversidad de metabolitos secundarios), que ayuden a combatir diversas enfermedades bacterianas que enfrenta la producción acuícola.

## **I.1.OBJETIVOS**

### **I.1.1 OBJETIVO GENERAL**

Identificar compuestos con actividad antibacterial producidos por las microalgas marinas *Nannochloropsis oculata* y *Porphyridium cruentum*.

### **I.1.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar el crecimiento de *Nannochloropsis oculata* y *Porphyridium cruentum* en sistema estático.
- Identificar a nivel de género las diferentes bacterias asociadas al cultivo de *Nannochloropsis oculata* y *Porphyridium cruentum*.
- Identificar a nivel de grupo los diferentes compuestos con actividad antibacterial producidos por *Nannochloropsis oculata* y *Porphyridium cruentum*.
- Evaluar el efecto inhibitorio de los agentes con actividad antibacterial producidos por *Nannochloropsis oculata* y *Porphyridium cruentum* en diferentes especies bacterianas.

## **II. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **II.1. Obtención de cepas de microalgas**

Las microalgas marinas que se utilizaron en el presente trabajo fueron *Nannochloropsis oculata*, la cual se obtuvo del Cepario del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), de La Universidad Autónoma de Baja California y *Porphyridium cruentum*, la cual se obtuvo del Cepario de Microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE (donada por la colección de microalgas del CIBNOR).

### **II.2. Técnica de cultivo de microalgas**

El cultivo de las microalgas se inició con inóculos sucesivos (escalamientos), partiendo con un volumen de 10 ml, continuando con 100 ml, 2 l y 10 l. Se utilizó el medio "f" formulado por Guillard y Ryther (1962). Toda el agua de mar que se utilizó se filtró a través de cartuchos de 10, 5 y 1  $\mu\text{m}$ , posteriormente se pasó por luz UV y se le inyectó ozono por 15 minutos, para la eliminación del ozono se le adicionó aireación continua por 30 minutos. Para la esterilización de volúmenes menores de agua de mar (100 ml y 2 l), ésta se realizó a través de una autoclave a 121 °C y 15 PSI durante 15 minutos y para la esterilización de volúmenes mayores de agua de mar (10 l), ésta fue química, agregando 3 ml de cloro comercial por cada litro de agua de mar y se dejó reposar durante 24 horas, posteriormente se le agregó tiosulfato de sodio ( $150 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de agua de mar), para la neutralización del cloro, agilizándolo la misma con aireación continua.

Una vez esterilizada el agua de mar se le agregaron cada uno de los nutrientes del medio "f" ( $1 \text{ ml}^{-1}$  de agua de mar).

Los cultivos se mantuvieron en sistema estático, a una temperatura de  $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), y una intensidad de luz de  $210 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (proporcionada con lámparas de luz fría), estas condiciones fueron controladas en el laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura (CICESE). Se trabajó con tres repeticiones para cada especie.

### **II.3. Análisis de la biomasa de microalgas**

Los cultivos en botellón se iniciaron con un inóculo de  $300 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$  para *P. cruentum* y de  $2 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$  para *N. oculata*; se realizaron mediciones diarias de pH, el cual fue controlado con inyecciones de  $\text{CO}_2$ , para mantener un pH entre 7.8-8.0. Así mismo se cuantificó el número de células, este conteo celular se realizó con un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad, adaptado con una reglilla. Cada tercer día se revisaron los cultivos en vivo para detectar cualquier contaminación por protozoarios que pudiera estar presente.

### **II.4. Cosecha de microalgas**

Una vez que los cultivos alcanzaron la fase de crecimiento lento, se filtraron 5 l de *N. oculata* y 3 l de *P. cruentum* a través de filtros Whatman GF/C de fibra de vidrio, de 4.7 cm de diámetro, separando así el paquete celular del sobrenadante. Inmediatamente después del filtrado, los filtros con el paquete celular se congelaron a  $-50 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se liofilizaron durante 24 h. El sobrenadante



se mantuvo a una temperatura de -20 °C para posteriormente hacer la extracción de los compuestos.

## **II.5. Aislamiento e identificación de bacterias asociadas a cultivos de microalgas**

Con la intención de aislar e identificar las especies de bacterias presentes en los cultivos de microalgas, se tomaron volúmenes conocidos de los cultivos de *P. cruentum* y *N. oculata* para el sembrado en caja petri con los medios agar marino (AM) y agar compuesto principalmente por tiosulfato de sodio, citrato de sodio, bilis de buey y sacarosa (TCBS) (aproximadamente 20 µl de medio para cada caja), la inoculación se realizó a través de la inyección directa del cultivo de ambas microalgas (por separado) en los dos medios y en dos diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  de agua de mar estéril y del cultivo de las microalgas en los diferentes medios. Una vez inoculadas las cajas petri, se incubaron durante 5 días a una temperatura de 27 °C, diariamente se realizaron conteos visuales directos de unidades formadoras de colonias (UFC) y se tomaron datos de color y forma de las mismas.

Posteriormente, se prosiguió con el aislamiento de las bacterias, el cual consistió en el sembrado de aquellas que tuvieron mayor crecimiento para separarlas del resto y así obtener monocultivos de una sola colonia.

Para la identificación de las bacterias aisladas se realizaron diferentes pruebas bioquímicas como oxidasa, catalasa, oxidación/fermentación, resistencia a la salinidad y al antibiótico 0/129, tinción Gram, API 20NE y prueba de movilidad, así como un análisis para observar características morfológicas y la toma de

fotografías a través de un microscopio Axioplan 2 magnin Carls Zeiss (100x con aceite de imersion).

Además, se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la purificación del 16s, la cual fue desarrollada en el Instituto de Sanidad Acuícola A.C. (ISA) de Ensenada Baja California por el M. en C. Adrián Mauricio García Ortega y la Dra. Rebeca Vásquez Yeomans. Los fragmentos del gen 16s ribosomal se amplificaron para secuenciarlos en La Universidad Estatal de San Diego, California (SDSU, Microchemical Core Facility). Una vez que se obtuvieron las secuencias, se analizaron en el programa MEGA 3.1, para la corrección de los nucleótidos no definidos y para la realización de un árbol filogenético y por último, las secuencias analizadas fueron comparadas con el banco de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information-Gene Bank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## **II.6. Extracción de compuestos**

Una vez cosechada la biomasa microalgal, se inició con la extracción de los compuestos que pudieran estar presentes.

La extracción del sobrenadante se realizó por cromatografía rápida por vacío propuesta por Blunt y colaboradores (1987), la cual consistió en pasar el sobrenadante a través de filtros de silica gel C<sub>18</sub> (octadecilfuncional), posteriormente se prosiguió a lavar la silica gel con agua destilada para la eliminación de sales, se comprobó la exclusión de las mismas con una prueba de precipitación, ésta consistió en añadir nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) al agua remanente,

si se presentaban formaciones blanquecinas en la misma, se continuaba con el lavado hasta que no se presentaran dichas formaciones y así constatar la eliminación de las sales. Por último se utilizaron 200 ml de metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) para lavar la silica gel y así recuperar los compuestos atrapados en ésta.

Para la extracción de compuestos del paquete celular se emplearon 4 disolventes en cascada (Hostettmann et al., 1986), inicialmente se utilizó hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ), después diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), posteriormente acetato de etilo ( $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ ) y por último metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ). Se realizó una triple extracción con cada disolvente.

Los filtros con la biomasa seca se colocaron en matraces de 500 ml y se les agregó 200 ml del primero de los disolventes (hexano), permaneciendo en agitación constante (en un agitador orbital unimax 1010, Heidolph), por un periodo de 2 h, después de este lapso se recuperó el disolvente remanente. Se utilizó la misma metodología para el resto de los disolventes.

Una vez que se obtuvieron los diferentes extractos recolectados de la triple extracción del paquete celular y del sobrenadante, se prosiguió con la rotaevaporación de los mismos, hasta obtener un volumen aproximado de 3 ml, los cuales se colocaron en viales de centelleo cubiertos con papel aluminio para evitar el paso de la luz. Este volumen se llevó a sequedad por medio de nitrógeno gaseoso. Una vez que se obtuvieron los extractos secos, se almacenaron en un congelador a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  para su posterior uso en los ensayos de bioactividad.

## **II.7. Identificación de grupos de compuestos**

La identificación de los diferentes compuestos obtenidos en los extractos de ambas especies de microalgas, se realizó a través de la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) en el “Center for Marine Biotechnology and Biomedicine” de La Universidad de California, San Diego, California, USA.

## **II.8. Ensayos de bioactividad**

### **II.8.1. Obtención de cepas bacterianas control**

Las bacterias patógenas de referencia que se utilizaron en el presente trabajo fueron *Vibrio splendidus* (CAIM 319), *Vibrio harveyi* (CAIM 513) y *Aeromonas hydrophila* (CAIM 347), las cuales fueron donadas por el Dr. Bruno Gómez Gil responsable de la “Collection of Aquacultural Important Microorganism” (CAIM) en el Centro de Investigación en Alimento y Desarrollo, A. C. (CIAD), unidad de Mazatlán.

### **II.8.2. Preparación de medios para los bioensayos**

Tanto las bacterias patógenas, previamente reactivadas con medio AM, Zobell, agar con soya tríptica (TSA) y TCBS, como las bacterias asociadas al cultivo de microalgas, se cultivaron en medio líquido Zobell, las cuales se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente y en agitación constante (200 rpm). Una vez transcurrido el periodo de incubación se prosiguió a la inoculación de una doble capa, la cual consistió en cajas petri estériles con una capa de medio Zobell sólido

(aproximadamente 20 ml), a la cual se le agregaron 200  $\mu$ l del cultivo bacteriano en líquido formando una capa homogénea. Esta técnica se realizó con tres repeticiones con cada una de las bacterias.

### **II.8.3. Difusión en placa**

Para los ensayos de inhibición bacteriana de los diferentes extractos, los cuales se resuspendieron en 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), se realizó el método de difusión en placa (Forber et al., 1999), mediante el uso de discos de papel filtro de 7 mm de diámetro, los cuales se impregnaron de los diferentes extractos (30  $\mu$ l), tanto del paquete celular como del sobrenadante y se dejaron secar durante 10 h a 37 °C, posteriormente se colocaron sobre la doble capa de bacterias inoculadas; al término de 24 h de incubación y a una temperatura de 26 °C, se midieron los halos de inhibición en mm con la ayuda de un vernier, los cuales se tomaron como una indicación de la producción de, por lo menos, un metabolito antibacteriano por parte de ambas microalgas. Como controles se utilizaron sensidiscos impregnados del antibiótico ampicilina, (5  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), de DMSO y un control de contaminación que consistió en cajas petri con medio sin inocular.

### **II.9. Análisis estadístico**

Con los diferentes datos de inhibición del crecimiento bacteriano se realizó una ANOVA de dos vías y pruebas *a posteriori* (Duncan) para poder encontrar las posibles diferencias entre los tratamientos ensayados.

### III. RESULTADOS

#### III.1. Cultivo de microalgas

Los cultivos de *N. oculata* y de *P. cruentum* se mantuvieron en sistema estático hasta la fase de crecimiento lento, para el caso de *N. oculata*, la biomasa fue recolectada el día 14 de cultivo, ésta alcanzó una concentración celular aproximada de  $78 \times 10^6$  cél·ml<sup>-1</sup> (Fig. 1) y una tasa de crecimiento ( $\mu$ ) máxima, al día 3 (0.89), para el caso de *P. cruentum*, ésta se cosechó al día 19 de cultivo con una concentración celular aproximada de  $51 \times 10^5$  cél·ml<sup>-1</sup> (Fig. 1), la máxima tasa de crecimiento fue el día 4 (0.96).

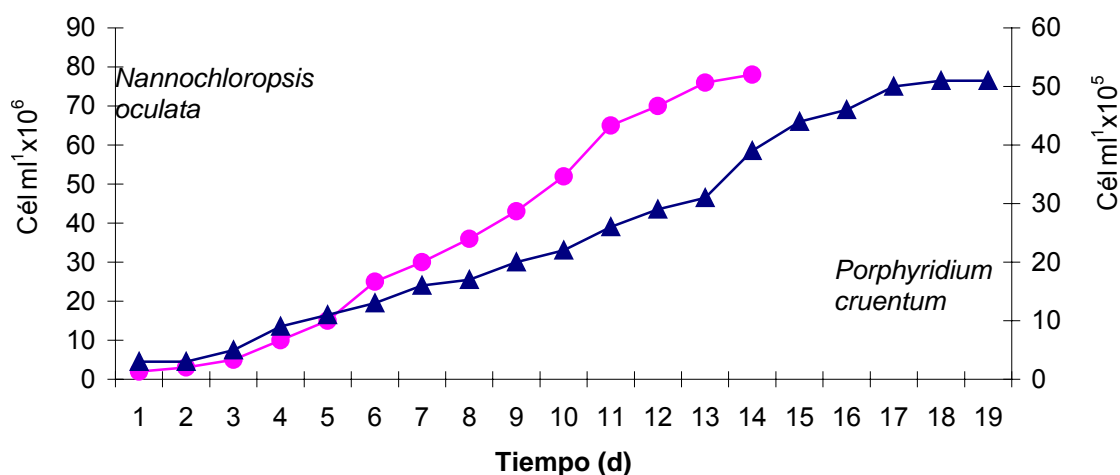


Figura 1. Curva de crecimiento de las microalgas *Nannochloropsis oculata* (●) y *Porphyridium cruentum* (▲) en sistema estático.

### **III.2. Identificación de bacterias asociadas a cultivos de microalgas**

En la figura 2, se muestran los resultados de la tinción Gram y las características morfológicas, de las diferentes bacterias asociadas a los cultivos de microalgas. En el panel C, se presentan bacterias en forma de cocos con arreglos lineales y con tinción Gram positiva, el resto (paneles A, B, D, E y F) fueron Gram negativas y una morfología de bacilos.

#### **III.2.1. Pruebas bioquímicas**

En la tabla V se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas de las bacterias aisladas de los cultivos de *P. cruentum* y *N. oculata*. Se observa que la mayoría fueron Gram negativas a excepción de la bacteria III aislada del cultivo de *P. cruentum*, esta bacteria también tuvo una respuesta positiva a la prueba de oxidación/fermentación. Todas las bacterias presentaron movilidad, una respuesta positiva a la exposición al 0/129 y resistencia a la salinidad en una concentración del 6 al 10%, sin embargo no todas fueron resistentes a concentraciones menores (0 y 3%).

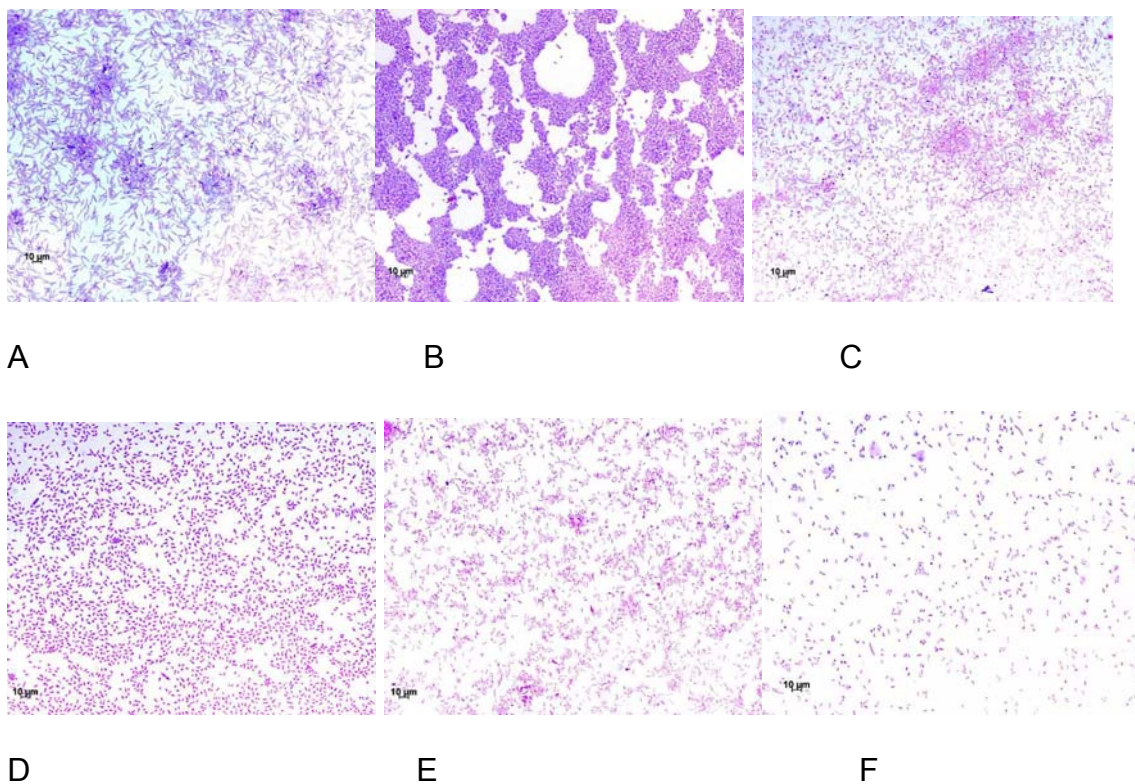


Figura 2. Bacterias aisladas del cultivo de *Porphyridium cruentum* (A, B y C). Bacterias aisladas del cultivo de *Nannochloropsis oculata* (D, E y F).

Tabla V. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias aisladas de los cultivos de *Porphyridium cruentum* y *Nannochloropsis oculata*.

| Bacteria         | Oxi. | Cat. | Salinidad |    |    |    |     | 0/129 | Mov. | O/F | Tinción Gram |
|------------------|------|------|-----------|----|----|----|-----|-------|------|-----|--------------|
|                  |      |      | 0%        | 3% | 6% | 8% | 10% |       |      |     |              |
| I <sup>1</sup>   | +    | +    | +         | +  | +  | +  | +   | +     | +    | -   | -            |
| II <sup>1</sup>  | +    | -    | -         | +  | +  | ±  | ±   | ±     | +    | -   | -            |
| III <sup>1</sup> | -    | +    | -         | +  | +  | ±  | ±   | ±     | ±    | ±   | +            |
| I <sup>2</sup>   | -    | -    | -         | -  | +  | ±  | ±   | ±     | +    | -   | -            |
| II <sup>2</sup>  | +    | -    | -         | -  | +  | ±  | ±   | +     | ±    | -   | -            |
| III <sup>2</sup> | +    | +    | +         | +  | +  | +  | +   | +     | +    | -   | -            |

I<sup>1</sup>, II<sup>1</sup> y III<sup>1</sup> Bacterias aisladas del cultivo de *P. cruentum*.

I<sup>2</sup>, II<sup>2</sup> y III<sup>2</sup> Bacterias aisladas del cultivo de *N. oculata*.

Oxi-Oxidasa.

Cat-Catalasa.

0/129-Sensibilidad al antibiótico 0/129.

Mov-Movilidad

O/F-Oxidación-Fermentación



### III.2.2. Pruebas moleculares (PCR y Secuenciación)

En el cultivo de *P. cruentum* se encontraron dos especies, la primera pertenece al género *Ahrensia* a la segunda al género *Planomicrobium*. Para el caso de las bacterias aisladas del cultivo de *N. oculata* las especies encontradas pertenecen a los géneros *Ahrensia* y *Vibrio*. La tabla VI muestra el porcentaje de similitud de las secuencias de las bacterias aisladas de los diferentes cultivos con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Tabla VI. Similitud de las secuencias purificadas de las diferentes bacterias aisladas de los cultivos de *Porphyridium cruentum* y *Nannochloropsis oculata*. Banco de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

| Bacteria         | Género                    | Similitud (%) |
|------------------|---------------------------|---------------|
| I <sup>1</sup>   | NI                        |               |
| II <sup>1</sup>  | <i>Ahrensia</i> sp.       | 98            |
| III <sup>1</sup> | <i>Planomicrobium</i> sp. | 98            |
| I <sup>2</sup>   | <i>Vibrio</i> sp.         | 98            |
| II <sup>2</sup>  | NI                        |               |
| III <sup>2</sup> | <i>Ahrensia</i> sp.       | 98            |

I<sup>1</sup>, II<sup>1</sup> y III<sup>1</sup> Bacterias aisladas del cultivo de *P. cruentum*.

I<sup>2</sup>, II<sup>2</sup> y III<sup>2</sup> Bacterias aisladas del cultivo de *N. oculata*.

NI-Bacteria no identificada

La figura 3 nos muestra la relación filogenética existente entre las secuencias de las especies de bacterias aisladas de los cultivos de microalgas, con las secuencias tomadas del NCBI para la formación de un árbol filogenético de diferentes bacterias. En esta misma figura, se puede observar que las especies

del género *Ahrensia* se encuentran dentro de la familia Rhodobacteriaceae, *Vibrio* sp. pertenece a la familia Vibrionaceae y *Planomicrobium* sp., se encuentra dentro de la familia Planococcaceae.

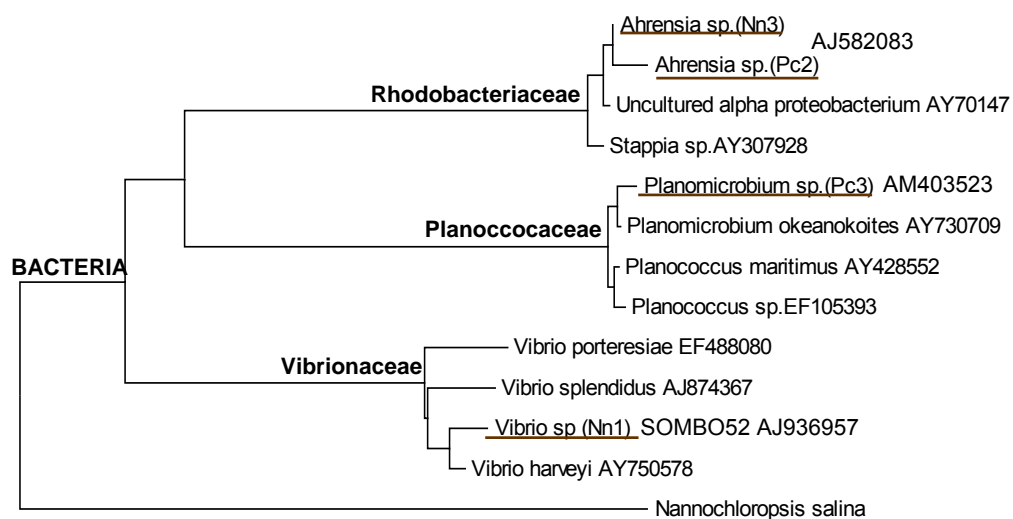


Figura 3. Árbol filogenético de las diferentes bacterias asociadas a los cultivos de *Nannochloropsis oculata* y *Porphyridium cruentum* (subrayadas) y su similitud con otras bacterias cercanas.

### III.3. Identificación de compuestos

La identificación de los diferentes compuestos en el presente trabajo, producidos por las microalgas *N. oculata* y *P. cruentum*, se realizó sólo a nivel de grandes grupos, como ácidos grasos, clorofila, esteroides y alcoholes, ya que se presentaron varias limitantes, una de ellas fue la poca cantidad de muestra para

su evaluación en el proceso de resonancia magnética nuclear y por otro lado que en la realización de dicho proceso se presentaron pérdidas considerables de las muestras.

#### **III.4. Concentración de los extractos**

En la tabla VII se muestran las concentraciones ( $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) de los diferentes extractos utilizados para los bioensayos de actividad antimicrobiana, se indican dos concentraciones: 1) extractos utilizados con las bacterias control y 2) extractos utilizados con las bacterias aisladas de los cultivos de microalgas. Sólo en los dos extractos del paquete celular de ambas microalgas con el disolvente metanol, se obtuvieron concentraciones altas ( $120.0$  y  $76.7 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

#### **III.5. Actividad antimicrobiana**

En general las bacterias presentaron sensibilidad a los diferentes extractos (Tabla VIII) en donde *V. splendidus* (Figura 4A), *A. hydrophila* (Figura 4B) (bacterias control), *Vibrio* sp. y *Ahrensia* sp. (bacterias aisladas del cultivo de *N. oculata*), fueron sensibles a los 10 extractos, por otro lado *V. harveyi* no presentó inhibición con los extractos de MeOH-S de ambas especies de microalgas ni con el extracto de Nn-HEX. *Planomicrobium* sp. no mostró inhibición con el extracto Pc-AcEOT y *Ahrensia* sp. (bacteria aisladas del cultivo de *P. cruentum*), no mostró inhibición a los extractos de Nn-AcEOT, Nn-MeOH, Pc-HEX y Pc-AcOET.

Tabla VII. Peso de los extractos ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) obtenidos de *Nannochloropsis oculata* (Nn) y de *Porphyridium cruentum* (Pc) con: Hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etilo (AcOET), metanol del paquete celular (MeOH-C) y metanol del sobrenadante (MeOH-S).

| Extracto  | Peso ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) |        |
|-----------|---|--------|
|           | 1                                       | 2      |
| Nn-HEX    | 33.33                                   | 20.00  |
| Nn-DCM    | 33.33                                   | <20.00 |
| Nn-AcOET  | <33.33                                  | 20.00  |
| Nn-MeOH-C | 120.00                                  | 80.00  |
| Nn-MeOH-S | 33.33                                   | <20.00 |
| Pc-HEX    | <33.33                                  | <20.00 |
| Pc-DCM    | 33.33                                   | <20.00 |
| Pc-AcOET  | 33.33                                   | <20.00 |
| Pc-MeOH-C | 76.70                                   | 20.00  |
| Pc-MeOH-S | 33.33                                   | <20.00 |

1-Antes de la identificación a través de la prueba de resonancia magnética nuclear (RMN).

2-Después de la identificación a través de la prueba de resonancia magnética nuclear (RMN).



A



B

Figura 4. Halos de inhibición. A: Sensidisco impregnado con extracto de la microalga *Nannochloropsis oculata* del sobrenadante, con el disolvente metanol y ensayado con la bacteria *Vibrio splendidus* y B: Sensidisco impregnado con extracto de la microalga *Porphyridium cruentum* del paquete celular, con el disolvente metanol y ensayado con la bacteria *Aeromonas hydrophila*.

Los análisis estadísticos realizados (Tabla IX y X) mostraron una diferencia altamente significativa ( $p=0.000$ ) entre la mayoría de las respuestas de inhibición de las bacterias, así como una diferencia significativa ( $p=0.01$ ) entre la capacidad de inhibición de los diferentes extractos, en cuanto a la comparación entre las dos especies de microalgas, no se observó diferencias significativas ( $p>0.05$ ).

Los extractos que tuvieron mayor efecto de inhibición con las 8 bacterias ensayadas son los que se extrajeron con el disolvente acetato de etilo (9.92 mm de inhibición), siendo diferente a los extractos de hexano y metanol, pero no al extracto de diclorometano (8.97 mm de inhibición) y los menores diámetros de inhibición se presentaron con los compuestos celulares extraídos con el disolvente hexano con 7.80 mm de diámetro. (Tabla IX).

Tabla VIII. Resultados de inhibición, de las diferentes bacterias. Sin inhibición (-) y con inhibición (+).

| Microalga                      | Extracto | Bacterias control        |                             |                       | Bacterias aisladas               |  |                                |                 |                                  |
|--------------------------------|----------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------|----------------------------------|--|--------------------------------|-----------------|----------------------------------|
|                                |          | <i>Vibrio splendidus</i> | <i>Aeromonas hydrophila</i> | <i>Vibrio harveyi</i> | <i>Ahrensia</i> sp. <sup>1</sup> | <i>Planomicrobium</i> sp. <sup>1</sup> | <i>Vibrio</i> sp. <sup>2</sup> | NI <sup>2</sup> | <i>Ahrensia</i> sp. <sup>2</sup> |
| <i>Nannochloropsis oculata</i> | HEX      | +                        | +                           | -                     | +                                | +                                      | +                              | -               | +                                |
|                                | AcOET    | +                        | +                           | +                     | -                                | +                                      | +                              | +               | +                                |
|                                | DCM      | +                        | +                           | +                     | +                                | +                                      | +                              | -               | +                                |
|                                | MeOH-C   | +                        | +                           | +                     | -                                | +                                      | +                              | -               | +                                |
|                                | MeOH-S   | +                        | +                           | -                     | +                                | +                                      | +                              | -               | +                                |
| <i>Porphyridium cruentum</i>   | HEX      | +                        | +                           | +                     | -                                | +                                      | +                              | -               | +                                |
|                                | AcOET    | +                        | +                           | +                     | -                                | -                                      | +                              | +               | +                                |
|                                | DCM      | +                        | +                           | +                     | +                                | +                                      | +                              | -               | +                                |
|                                | MeOH-C   | +                        | +                           | +                     | +                                | +                                      | +                              | -               | +                                |
|                                | MeOH-S   | +                        | +                           | -                     | +                                | +                                      | +                              | -               | +                                |
|                                | AMPI     | +                        | +                           | +                     | +                                | +                                      | +                              | -               | +                                |

<sup>1</sup> Bacterias aisladas del cultivo de *P. cruentum*.

<sup>2</sup> Bacterias aisladas del cultivo de *N. oculata*.

NI- Bacteria no identificada

AMPI-ampicilina 5 mg·ml<sup>-1</sup>

Tabla IX. Prueba *a posteriori* (Duncan) de inhibición en mm (halos) de los diferentes extractos de ambas microalgas.

| Extractos                   | (mm)               |
|-----------------------------|--------------------|
| Acetato de etilo            | 9.92 <sup>a</sup>  |
| Diclorometano               | 8.97 <sup>ab</sup> |
| Metanos del sobrenadante    | 8.50 <sup>b</sup>  |
| Metanol del paquete celular | 7.95 <sup>b</sup>  |
| Hexano                      | 7.80 <sup>b</sup>  |

Subíndices: letras iguales indican falta de diferencia significativa.

La sensibilidad de las bacterias *A. hydrophila* y *Ahrensia* sp. (ésta última aislada del cultivo de *N. oculata*), a los diferentes extractos no fue significativa ( $p > 0.05$ ), tampoco se observaron diferencias entre la sensibilidad de *Planomicrobium* sp. (Figura 5A) y *V. harveyi*. La bacteria con mayor respuesta de inhibición a los diferentes extractos fue *Vibrio* sp. (Figura 5B) (16.28 mm de inhibición), por el contrario la bacteria no identificada (NI) presentó una diferencia altamente significativa con el resto de las bacterias ensayadas, con un halo de inhibición de 1.61 mm (Tabla X).

En la tabla XI se muestran los promedios de los halos de inhibición de las bacterias control con todos los extractos, encontrando el valor máximo (12.00 mm) con el disolvente diclorometano (DCM) (extracto celular de *P. cruentum*) y con las bacterias *A. hydrophila* y *V. harveyi*, siendo este valor similar al resultado obtenido con el control positivo (ampicilina 5 mg ml<sup>-1</sup>).

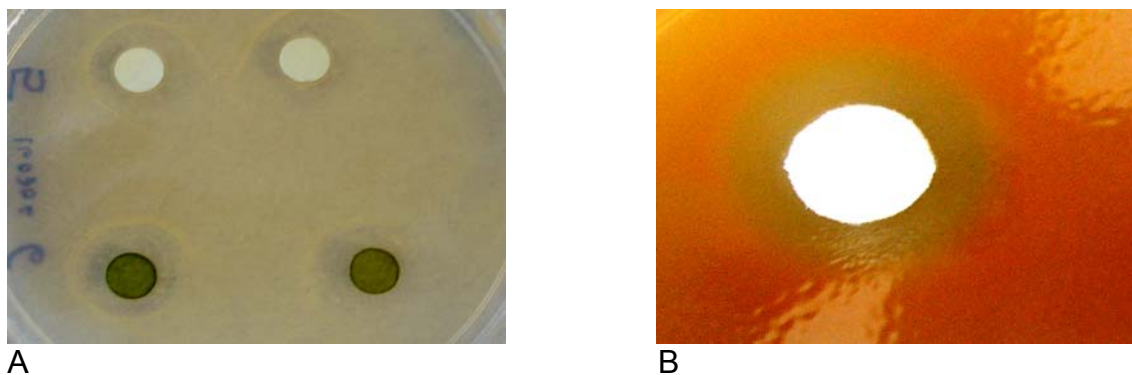


Figura 5. Halos de inhibición. A: Sensidiscos impregnados con extractos de la microalga *Nannochloropsis oculata*, parte superior con el disolvente metanol e inferior con el disolvente diclorometano y ensayado con la bacteria *Planomicrobium* sp. B: Sensidisco impregnado con el extracto de la microalga *Nannochloropsis oculata*, con el disolvente metanol y ensayado con la bacteria *Vibrio* sp.

Tabla X. Prueba *a posteriori* (Duncan), de las respuestas de inhibición en mm (halos) de las diferentes bacterias con los 10 diferentes extractos.

| Bacteria                               | (mm)               |
|--|--------------------|
| <i>Vibrio</i> sp. <sup>2</sup>         | 16.28 <sup>a</sup> |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>            | 10.23 <sup>b</sup> |
| <i>Ahrensia</i> sp. <sup>2</sup>       | 9.77 <sup>b</sup>  |
| <i>Vibrio splendidus</i>               | 9.63 <sup>bc</sup> |
| <i>Planomicrobium</i> sp. <sup>1</sup> | 8.25 <sup>c</sup>  |
| <i>Vibrio harveyi</i>                  | 7.48 <sup>c</sup>  |
| <i>Ahrensia</i> sp. <sup>1</sup>       | 5.76 <sup>d</sup>  |
| NI <sup>2</sup>                        | 1.61 <sup>e</sup>  |

<sup>1</sup> Bacterias aisladas del cultivo de *P. cruentum*.

<sup>2</sup> Bacterias aisladas del cultivo de *N. oculata*.

NI-bacteria no identificada.

Subíndices: letras iguales indican falta de diferencia significativa.

El control positivo para *V. splendidus* fue de 14.00 mm, siendo mayor al valor más alto de esta especie con el extracto de MeOH-S (inhibición de 11.33 mm). Se puede observar que *V. harveyi* no presentó halos inhibitorios con los extractos de Nn-HEX ni de MeOH-S de ambas microalgas.



En general, *Vibrio* sp. presentó mayor sensibilidad a los extractos (Tabla XII). El valor máximo de inhibición de 20.00 mm, fue mayor al valor obtenido con el control positivo (ampicilina 5 mg·ml<sup>-1</sup>) con 14.17 mm en esta especie. Por otro lado la bacteria no identificada (NI) fue resistente a la mayoría de los compuestos, encontrándose solo inhibición a los extractos de AcOET con valores muy bajos (8.00 y 8.17 mm), similares al del control positivo (8.50 mm).

Tabla XI. Inhibición de las bacterias control en mm (halos) de los diferentes extractos obtenidos con: Hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etilo (AcOET), metanol del paquete celular (MeOH-C) y metanol del sobrenadante (MeOH-S), (desviación estándar entre paréntesis).

| Microalga                      | Extracto | Bacterias control        |        |                             |        |                       |        |
|--------------------------------|----------|--------------------------|--------|-----------------------------|--------|-----------------------|--------|
|                                |          | <i>Vibrio splendidus</i> |        | <i>Aeromonas hydrophila</i> |        | <i>Vibrio harveyi</i> |        |
| <i>Nannochloropsis oculata</i> | HEX      | 9.67 <sub>d</sub>        | (1.26) | 10.83 <sub>cd</sub>         | (1.04) | 0.00 <sub>e</sub>     | (0.00) |
|                                | DCM      | 9.33 <sub>d</sub>        | (0.76) | 9.50 <sub>d</sub>           | (1.80) | 9.67 <sub>d</sub>     | (1.61) |
|                                | AcOET    | 8.67 <sub>d</sub>        | (1.15) | 10.83 <sub>cd</sub>         | (1.44) | 11.67 <sub>cd</sub>   | (2.08) |
|                                | MeOH-C   | 10.67 <sub>cd</sub>      | (0.58) | 9.50 <sub>d</sub>           | (0.87) | 10.50 <sub>cd</sub>   | (1.32) |
|                                | MeOH-S   | 11.33 <sub>cd</sub>      | (1.53) | 10.83 <sub>cd</sub>         | (1.76) | 0.00 <sub>e</sub>     | (0.00) |
| <i>Porphyridium cruentum</i>   | HEX      | 10.83 <sub>cd</sub>      | (1.76) | 10.67 <sub>cd</sub>         | (0.58) | 8.67 <sub>d</sub>     | (0.58) |
|                                | DCM      | 8.00 <sub>d</sub>        | (0.00) | 12.00 <sub>cd</sub>         | (1.50) | 12.00 <sub>cd</sub>   | (1.50) |
|                                | AcOET    | 9.67 <sub>d</sub>        | (0.76) | 9.83 <sub>cd</sub>          | (0.29) | 11.83 <sub>cd</sub>   | (3.33) |
|                                | MeOH-C   | 9.50 <sub>d</sub>        | (1.50) | 10.17 <sub>cd</sub>         | (1.26) | 10.17 <sub>cd</sub>   | (1.26) |
|                                | MeOH-S   | 8.67 <sub>d</sub>        | (0.58) | 10.83 <sub>cd</sub>         | (1.76) | 0.00 <sub>e</sub>     | (0.00) |
| Control positivo               | AMPI     | 14.00                    | (1.00) | 11.00                       | (1.80) | 11.67                 | (2.89) |

Subíndices: letras iguales indican falta de diferencia significativa.

AMPI-ampicilina 5 mg·ml<sup>-1</sup>.

Se observaron diferencias significativas en la respuesta de inhibición ( $p > 0.05$ ) entre las dos especies de *Ahrensia* (encontradas en ambos cultivos de microalgas), siendo más resistente a los extractos la bacteria aislada del cultivo de *P. cruentum*, ya que no fue inhibida con ninguno de los extractos con AcOET, ni con los de Pc-HEX y de Nn-MeOH-C.

Tabla XII. Inhibición en mm de los diferentes extractos probados con bacterias aisladas de los diferentes cultivos de microalgas, hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etilo (AcOET), metanol del paquete celular (MeOH-C) y metanol del sobrenadante (MeOH-S), (desviación estándar entre paréntesis).

| Microalga                      | Extracto | Bacterias aisladas               |        |  |        |                                |        |                   |        |                                  |        |
|--------------------------------|----------|----------------------------------|--------|--|--------|--------------------------------|--------|-------------------|--------|----------------------------------|--------|
|                                |          | <i>Ahrensia</i> sp. <sup>1</sup> |        | <i>Planomicrobium</i> sp. <sup>1</sup> |        | <i>Vibrio</i> sp. <sup>2</sup> |        | NI <sup>2</sup>   |        | <i>Ahrensia</i> sp. <sup>2</sup> |        |
| <i>Nannochloropsis oculata</i> | HEX      | 9.83 <sub>cd</sub>               | (1.04) | 8.83 <sub>d</sub>                      | (1.04) | 15.33 <sub>b</sub>             | (1.53) | 0.00 <sub>e</sub> | (0.00) | 9.67 <sub>d</sub>                | (0.58) |
|                                | AcOET    | 0.00 <sub>e</sub>                | (0.00) | 9.17 <sub>d</sub>                      | (0.29) | 19.67 <sub>a</sub>             | (1.53) | 8.17 <sub>d</sub> | (0.29) | 9.67 <sub>d</sub>                | (0.58) |
|                                | DCM      | 11.50 <sub>cd</sub>              | (0.50) | 13.50 <sub>bc</sub>                    | (1.32) | 18.83 <sub>a</sub>             | (1.04) | 0.00 <sub>e</sub> | (0.00) | 9.00 <sub>d</sub>                | (1.73) |
|                                | MeOH-C   | 0.00 <sub>e</sub>                | (0.00) | 8.00 <sub>d</sub>                      | (0.00) | 20.00 <sub>a</sub>             | (0.00) | 0.00 <sub>e</sub> | (0.00) | 8.33 <sub>d</sub>                | (0.58) |
|                                | MeOH-S   | 8.83 <sub>e</sub>                | (0.29) | 8.17 <sub>d</sub>                      | (0.29) | 17.33 <sub>a<sub>b</sub></sub> | (1.15) | 0.00 <sub>e</sub> | (0.00) | 8.00 <sub>d</sub>                | (0.00) |
| <i>Porphyridium cruentum</i>   | HEX      | 0.00 <sub>e</sub>                | (0.00) | 8.00 <sub>d</sub>                      | (0.00) | 14.67 <sub>bc</sub>            | (0.58) | 0.00 <sub>e</sub> | (0.00) | 7.83 <sub>d</sub>                | (0.29) |
|                                | AcOET    | 0.00 <sub>e</sub>                | (0.00) | 0.00 <sub>e</sub>                      | (0.00) | 13.83 <sub>bc</sub>            | (1.04) | 8.00 <sub>d</sub> | (0.00) | 12.33 <sub>c</sub>               | (0.58) |
|                                | DCM      | 9.83 <sub>cd</sub>               | (1.04) | 10.17 <sub>cd</sub>                    | (0.76) | 15.33 <sub>b</sub>             | (1.15) | 0.00 <sub>e</sub> | (0.00) | 11.00 <sub>cd</sub>              | (0.00) |
|                                | MeOH-C   | 9.50 <sub>d</sub>                | (1.32) | 8.33 <sub>d</sub>                      | (0.58) | 13.83 <sub>bc</sub>            | (1.04) | 0.00 <sub>e</sub> | (0.00) | 8.33 <sub>d</sub>                | (0.58) |
|                                | MeOH-S   | 8.00 <sub>d</sub>                | (0.00) | 8.67 <sub>d</sub>                      | (0.58) | 14.00 <sub>bc</sub>            | (2.65) | 0.00 <sub>e</sub> | (0.00) | 9.83 <sub>cd</sub>               | (1.04) |
| Control positivo               | AMPI     | 27.33                            | (1.15) | 23.33                                  | (0.58) | 14.17                          | (1.04) | 8.50              | (0.71) | 23.67                            | (1.53) |

<sup>1</sup> Bacterias aisladas del cultivo de *P. cruentum*.

<sup>2</sup> Bacterias aisladas del cultivo de *N. oculata*.

Subíndices: letras iguales indican falta de diferencia significativa.

NI-Bacteria no identificada

AMPI-ampicilina 5 mg·ml<sup>-1</sup>

#### IV. DISCUSIÓN

La aparición de enfermedades bacterianas en la acuicultura, es controlada principalmente a través de la aplicación de agentes bactericidas. Los antibióticos más utilizados en esta industria son penicilina, amoxicilina, cloramfenicol, furazolidona, ácido oxolínico, oxitetraciclina, clorotetraciclina, entre otros (Miranda, 2004). Sin embargo, la utilización de algunos de ellos está prohibida en varios países, ya que existen diversos problemas asociados a su uso, como el desarrollo de resistencia de las bacterias a dichos compuestos, lo que provoca un impacto en la acuicultura, en la salud humana y en el ambiente (principalmente por la permanencia en el medio) (Boyd y Massaut, 1999; Skjerme y Vadstein, 1999).

Con la intención de contribuir en la búsqueda de compuestos con actividad antibacteriana a partir de fuentes naturales, en el presente trabajo se encontraron compuestos que comúnmente se encuentran en las microalgas como esteroides y ácidos grasos, (Fenical, 2006, com. per.), algunos de los cuales han sido considerados con actividad antibacteriana. Marshall y colaboradores (2005), reportaron que el ácido eicosapentaenóico en altas concentraciones es capaz de inhibir el crecimiento de *Vibrio fischeri*, presente en cultivos de peces damisela.

La mayoría de los extractos de microalgas obtenidos y evaluados en el presente trabajo, originaron inhibición en las diferentes bacterias patógenas y no

patógenas, así como en Gram negativas y en Gram positivas (*Ahrensia* sp., *Aeromonas hydrophila*, *Planomicrobium* sp., *Vibrio harveyi*, *Vibrio splendidus*, *Vibrio* sp.), lo que indica que son compuestos antibacterianos que pueden tener potencial en la industria acuícola. La bacteria NI fue la que presentó mayor resistencia a la mayoría de los extractos ensayados, por lo que se recomienda continuar con ensayos adicionales para verificar estos resultados.

Entre los disolventes utilizados para la extracción de compuestos bioactivos, presentes en las microalgas, se han utilizado agua destilada, hexano, etanol, acetona, metanol, diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, ácido acético, etc. (Skulberg, 2000; Das et al., 2005 y Volk, 2005), debido a esto, la gran variedad de compuestos extraídos y reportados en microalgas, está en función del disolvente utilizado y la especie cultivada, aunado a esto, encontramos la sensibilidad de los diferentes patógenos, por lo tanto es muy difícil comparar los resultados de nuestro trabajo con los obtenidos por otros autores.

Los extractos de *Nannochloropsis oculata* y *Porphyridium cruentum*, obtenidos con los diferentes disolventes, originaron halos de inhibición (de 7.83 a 20.00 mmØ), similares a los obtenidos por Bernaldez (2005), la cual experimentó con tres extractos de la microalga *P. cruentum*, ensayados con bacterias patógenas para humanos (*Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas auriginosa*). Otra microalga que ha sido reportada como productora de compuestos bioactivos es *Tetraselmis suecica*, estos compuestos mostraron inhibición en el crecimiento de la bacteria patógena *Staphylococcus aureus*

(Murillo, 2001). Ozdemir y colaboradores (2004), observaron inhibición con extractos de *Spirulina platenses*, ensayados en la bacteria *Staphylococcus epidermidis*.

Valores menores de inhibición, a los reportados en el presente trabajo, se obtuvieron a través de la investigación de Torres-Ariño (2001), con extractos de diferentes cepas de cianobacterias (*Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *Spirulina subsalsa*, entre otras), estos fueron ensayados con microorganismos patógenos para el humano (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, entre otras). Por otro lado Ördög y colaboradores (2004), también observaron valores menores de inhibición en las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas syringiae* y *Bacillus thuringiensis*, con extractos de las microalgas *Desmococcus olivaceus* y *Chlorella* sp. Pushparaj y colaboradores (1999), igualmente obtuvieron valores menores de inhibición, con la cianobacteria marina *Nodularia harveyana*, estos extractos fueron ensayados con las eubacterias *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* y *S. pyogenes*.

En nuestro trabajo la bacteria *Aeromonas hydrophila*, causante de septicemia hemorrágica en cultivos de peces marinos, presentó sensibilidad (halos de inhibición de 9.50 a 12.00 mmØ), a los diversos extractos de *N. oculata* y *P. cruentum*. Das y colaboradores (2005), observaron resultados similares de inhibición, con extractos de la microalga de agua dulce *Euglena viridis*. Naviner y

colaboradores (1999), no observaron inhibición de *A. hydrophila* con el extracto de la microalga *Skeletonema costatum*.

Con base en los resultados anteriores de sensibilidad por parte de la bacteria *A. hydrophila*, se sugiere la utilización de los diferentes extractos producidos por *N. oculata* y *P. cruentum* como posible alternativa para su uso en la industria acuícola.

En el presente trabajo, se aisló la bacteria *Vibrio* sp., siendo ésta la más sensible a los diferentes extractos (halos de 13.83 a 20 mmØ). Extractos obtenidos con *Euglena viridis*, también han sido reportados como inhibidores del crecimiento bacteriano de varias especies de *Vibrio* (halos de 5 a 20 mmØ) (Das et al., 2005). Resultados similares fueron observados por Naviner y colaboradores (1999) con extractos de la microalga *Skeletonema costatum*, ensayados con varias especies del mismo género.

En este trabajo tres de los extractos de la microalga *N. oculata* mostraron mayor poder de inhibición ( $p < 0.05$ ) que el control positivo (Ampicilina 5mg/L) sobre la bacteria *Vibrio* sp., por lo que sería pertinente continuar con bioensayos adicionales en éste campo. Otro punto de apoyo para esta observación es el hecho de que *N. oculata* es exitosamente utilizada en cultivo de agua verde “green water”

En el cultivo de microalgas normalmente se desarrollan algunas bacterias asociadas (Riquelme y Avendaño-Herrera, 2003), éstas pueden inhibir (por la producción de sustancias alelopáticas y competencia por nutrientes) o estimular

el crecimiento de las microalgas (por la excreción de promotores de crecimiento tales como algunas vitaminas) (Fredrickson y Stephanopoulos, 1981).

Algunas de las investigaciones han sido enfocadas a la selección e identificación de microalgas y bacterias con propiedades benéficas que permitan ser utilizadas en cultivos mixtos (microalga-bacteria), esto ha permitido plantear alternativas para modificar las comunidades microbianas en cultivo (Olafsen, 2001). Asimismo, el conocimiento de interacciones específicas entre bacteria-microalga, nos permite la optimización de sistemas productivos para la acuicultura disminuyendo los costos, facilitando el manejo, reduciendo el uso de antibióticos y otros químicos que causan el deterioro ambiental (Riquelme y Avendaño-Herrera, 2003).

Para la identificación de las bacterias asociadas a los cultivos de microalgas existen limitantes, ya que aproximadamente sólo el 1% de las bacterias marinas son cultivables, aunado a esto, el costo involucrado en el desarrollo de las diferentes técnicas para llevar a cabo dicha caracterización (costos de reactivos, materiales y equipo de laboratorio), puede ser considerable. En este trabajo, de las bacterias presentes en los cultivos de las microalgas *N. oculata* y *P. cruentum*, se identificaron cuatro especies bacterianas, ya que se aislaron aquellas que tuvieron mayor crecimiento (mayor número de colonias).

La presencia o ausencia de las bacterias identificadas puede ser debido a la diferencia en las condiciones de cultivo (fase de crecimiento, calidad del agua, origen y tipo de cepa, entre otras). Iqbal y colaboradores (1993) aislaron e identificaron 3 bacterias de un cultivo de la microalga *P. cruentum* (cultivada con

agua de mar artificial, medio líquido, a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C y con una intensidad lumínica de  $75 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ), estas bacterias se encuentran dentro de los géneros *Achromobacter*, *Microbacterium* y *Cellulomonas*, estos autores mencionan que la presencia de estas bacterias puede estar en función de la cantidad y calidad de la producción del exopolisacárido a partir de la microalga *P. cruentum*.

Existe discrepancia en la identificación de especies de bacterias, ya que algunas son muy cercanas entre géneros y es difícil separarlas por especies. La bacteria *Planomicrobium* sp. (aislada del cultivo de *N. oculata*), pertenece a un género nuevo y se encuentra muy relacionada con el género *Planococcus*, lo cual ha dado motivo de controversia por la ubicación taxonómica de algunas especies en ambos géneros, por ejemplo: Dai y colaboradores (2005) proponen un reacomodo de las especies *Planococcus psychrophilus* y *Planococcus alkanoclasticus* al género *Planomicrobium*, los cuales, según el árbol filogenético obtenido del programa MEGA 3.1, con secuencias de diferentes bacterias del NCBI se ubican dentro de la Familia Planococcaceae (Fig. 3). Ambos géneros se caracterizan por ser bacterias marinas, aeróbicas, heterotróficas, Gram positivas, cocos móviles, oxidasa negativa y catalasa positiva. Para la identificación de la bacteria *Planomicrobium* sp. se basó principalmente en el porcentaje de similitud de 98 % del Banco de Datos NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information).

En el caso de *Vibrio* sp. (aislada en el presente trabajo), se encontró una mayor similitud con la especie *Vibrio harveyi*, que con las otras dos especies de



este género, lo que nos indica la posibilidad de que esta bacteria aislada pudiera ser un organismo patógeno, por lo tanto, da pie a continuar con las investigaciones para la identificación de especies asociadas a los cultivos de microalgas y su posible impacto negativo en la industria acuícola.

Los resultados indican que las microalgas *Nannochloropsis oculata* y *Porphyridium cruentum* pueden ser utilizadas en la industria acuícola con propósitos benéficos en respuesta a enfermedades infecciosas ocasionadas por bacterias, ya sea con la aplicación directa (cultivo verde con *Nannochloropsis oculata*) o bien indirecta con la extracción de compuestos de ambas especies.

## V. CONCLUSIONES

- Las bacterias asociadas al cultivo de la microalga *Nannochloropsis oculata* fueron *Ahrensia* sp. y *Vibrio* sp.
- Las bacterias asociadas al cultivo de la microalga *Porphyridium cruentum* fueron *Ahrensia* sp. y *Planomicrobium* sp.
- La identificación de las bacterias asociadas a los cultivos de microalgas se basó principalmente en el porcentaje de similitud de un fragmento de ADN 16s, con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information).
- La extracción de los diferentes metabolitos secundarios producidos por las microalgas *Nannochloropsis oculata* y *Porphyridium cruentum*, mostraron la capacidad de inhibir diferentes bacterias patógenas y no patógenas (*Aeromonas hydrophila*, *Ahrensia* sp., *Planomicrobium* sp., *Vibrio harveyi*, *Vibrio splendidus* y *Vibrio* sp.).
- La bacteria *Vibrio* sp. fue la que mostró mayor sensibilidad a los diferentes extractos ensayados.
- Los compuestos identificados fueron ácidos grasos, clorofila, esteroides y alcoholes.
- La bacteria NI (no identificada, aislada del cultivo de *Nannochloropsis oculata*), fue el organismo que presentó mayor resistencia a los diferentes extractos utilizados.

- La bacteria patógena *Vibrio harveyi* no presentó respuesta inhibitoria a los extractos de la microalga *Nannochloropsis oculata* (con los disolventes hexano y metanol del sobrenadante) y de la microalga *Porphyridium cruentum* (con el disolvente metanol del sobrenadante).

## VI. LITERATURA CITADA

- Antonella, R., D. Deidda, A. Serra, M. Deiana, M. Asunta y R. Pompei. 2005. Omega-3 fatty acid composition and biological activity of three microalgae species. *Journal of Food Agriculture & Environment* 3(2):120-124 p.
- Arredondo-Vega, B. O., C. J. Band-Schmidt y A. Greene-Yee. 1994. *Porphyridium cruentum*: Microalga roja con alto potencial biotecnológico. *Ciencia y Desarrollo*. 117:51-57 p.
- Arredondo-Vega, B. O. y R. Vázquez-Duhalt. 1991. Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo*. Vol. XVII. 99 p.
- Aubert, M., J. Aubert y M. Guathier. 1979. Marine algae in pharmaceutical science. H. A. Hoppe, T. Levring, Y. Tanaka (eds). Berlin. 267 p.
- Ayehunie, S., A. Belay, T. Baba y R. Ruprecht. 1998. Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*). *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Humand Retrovirology*. 18:7-12 p.
- Balcázar, J. L. 2002. Uso de probióticos en acuicultura: Aspectos generales. Facultad de Acuicultura, Universidad de Machala, Ecuador. 8:877-881 p.
- Belay, A., Y. Ota, K. Miyakaw y H. Shimamatsu. 1993. Current knowledge on potencial health benefits of *Spirulina*. *Journal of Applied Phycology* 5:235-241 p.
- Berge, J. P., H. Le-Bris; C. Roussakis y P. Durand. 1997. Antibiotic and antiproliferative activities of the marine diatom *Skeletonema costatum*. 4th-International-Marine-Biotechnology-conference-Abstracts Naples-Italy Arti-Grafiche-Solimene-Srl. 302 p.
- Bernald, B. R., D. J. Bonin y A. L. Cornu. 1972. The antibacterial substances of marine alga *Stichochrysis immobilis* (Chysophyta). *Journal of Phycology* 8:383-392 p.
- Bernaldez, S. J. 2005. Actividad antimicrobiana en microalgas y cianobacterias marinas. Tesis (Químico Farmacobiólogo). Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. 51 p
- Bloor, S. y R. R. England. 1989. Antibiotic production by the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Journal of Applied Phycology* 1:367-372 p.

- Bloor, S. y R. R. England. 1991. Elucidation and optimization of the medium constituents controlling antibiotic production by the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Enzyme Microbiology Technology* 13:76-81 p.
- Blunt, J. W., V. Calder, G. Fenwick, R. Lake, J. McCombs, M. Munro y N. Perry. 1987. Reverse phase flash chromatography: a method for the rapid partitioning of natural products extracts. *Journal of Natural Products*. 50(2):290-292 p.
- Borowitzka, M. A. 1995. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biological active compounds. *Journal of Applied Phycology* 7:3-15 p.
- Bower, S. M. 2003. Update on emerging abalone diseases and techniques for health assessment. *Journal of Shellfish Research*. 22(3)805-810 p.
- Boyd, C y L. Massaut. 1999. Risk associated whit the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquacultural Engineering*. 20:113-132 p.
- Brown, M. R., C. D. Garland, S. W. Jeffrey, I. D. Jameson y J. M. Leroi. 1993. The gross and aminoacid composition of batch and semi-continuos cultures of *Isochrysis* sp. (Clone T\_Iso), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Applied Phycology*. 5:285-296 p.
- Burkholder, P. R., L. M. Burkholder y L. R. Almodovar. 1960. Antibiotic activity of some marine algae of Puerto Rico. *Botánica Marina*. 2:149-156 p.
- Carmichael, W. W. 1992. A review: Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology* 72:445-449 p.
- Channell, R. J. P., S. J. Kellam, A. M. Owsianka y J. M. Walker. 1988. Result of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Medica*. 56:10-14 p.
- Chen, C., N. Imamura, M Nishijima, K Adachi, M Sakai y H. Sano. 1996. Halymecins, new antimicroalgal substances produced by fungi isolated from marine algae. *Journal of Antibiotics* 49(10):998-1005 p.
- Costa, F. N. y O. D. Rossi. 2002. Contamination by *Aeromonas* spp. in poultry slaughterhouse. *Archivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. 54 (5): 534-538 p.
- Cueneyt, S., F. Kuersat y S. Sahin. 2006. Ontogenic development of the digestive enzymes in common pandora, *Pagellus erythrinus*, L. larvae. *Aquaculture Research*. 37(15):1565-1571p.

- Dai, X., Y. N. Wang, B. J. Wang, S. J. Liu y Y. G. Zhou. 2005. *Planomicrobium chinense* sp. nov., isolated from coastal sediment, and transfer of *Planococcus psychrophilus* and *Planococcus alkanoclasticus* to *Planomicrobium* as *Planomicrobium psychrophilum* comb. nov. and *Planomicrobium alkanoclasticum* comb. nov. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology. 55:699-702 p.
- Das, B. K., J. Pradhan, P. Pattnaik, B. R. Samantaray y S. K. Samal. 2005. Production of antibacterials from the freshwater alga *Euglena viridis* (Ehren). World Journal of Microbiology and Biotechnology. 21:45-50 p.
- De Cano, M. M. S., M. C. Z. De Mulé, G. Z. De Caire y D. R. De Halperin. 1990. Inhibition of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* by phenolic compounds from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc muscorum*. Journal of Applied Phycology 2:79-81 p.
- De Kikenlin, P., CH. Michel y P. Ghittino. 1985. Tratado de las enfermedades de los peces. Acribia, S.A. Zaragoza España. 353 p.
- Dermound, D. y D. Chaumont. 1992. Modeling of growth of *Porphyridium cruentum* in connection with two interdependent factors: light and temperature. Bioresource Technology. 42:113-117 p.
- Diggles, B. K., J. Carson, P. M. Hine, R. W. Hickman y M. J. Tait. 2000. *Vibrio* species associated with mortalities in hatchery-reared turbot (*Colistium nudipinnis*) and brill (*C. guntheri*) in New Zealand. Aquaculture. 183:1-12 p.
- Douglas, D. J. y S. S. Bates. 1992. Production of domoic acid, a neurotoxic aminoacid, by an axenic culture of the marine diatom *Nitzschia pungens*. Hasle. Canadian Journal of Fisheries and Aquatics Sciences. 49:85-90 p.
- Duff, D. B. C., D. L. Bruce y N. J. Antia. 1966. The antibacterial activity of marine planktonic algae. Canadian Journal of Microbiology. 12:877-884 p.
- Fábregas, J., D. García, M. Fernández-Alonso, A. I. Rocha, P. Gómez-Puerta, J. M. Escribano, A. Otero y J.M. Coll. 1999. In vitro inhibition of the replication of haemorrhagic septicemia virus (VHSV) and African swing fever virus (ASFV) by extract from marine microalgae. Antiviral Research. 44:67-73 p.
- Falch, B. C., G. M. König y A. D. Wright. 1992. Antibacterial and cytotoxic compounds from the blue-green algae *Fischerella ambigua*. Planta Medica. 58:654-655 p.
- Faulkner, D. J. 1995. Marine natural products. Natural Products Reports. 12:223-269 p.

- Findaly, J. A. y A. D. Patil. 1984. Antibacterial constituents of the diatom *Navicula delognei*. *Journal of Natural Products* 47:815-818 p.
- Forber, B., D. Sahm y A. Weissfeld. 1999. *Diagnostic microbiology*. Ed. Mosby. Londres, Inglaterra. 833 p.
- Fuentes, J. M. y J. A. Pérez. 1998. Isolation of *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinaria México*. 29(1):117-119 p.
- Fukui, S. 1979. Studies on amino acid metabolism of diabetics II. With special reference to the effect of *Chlorella*. *Kiso to Rinsho*. 13:289-300 p.
- Gay, M., D. Saulnier, N. Faury y F. Le Roux. 2003. Epidemiological study of vibriosis. *Actes de colloques. Institut Francais de Recherche pour l'Exploitation de la Mer*. 38:196-202 p.
- Ginzberg, A., M. Cohen, U. A. Sod-Moriah, S. Shany, A. Rosenshtrauch y S. Arad. 2000. Chickens fed with biomass of the red microalgae *Porphyridium* sp. Have reduced blood cholesterol level and modified fatty acid composition in egg yolk. *Journal of Applied Phycology*. 12:325-330 p.
- Gómez-León, J., L. Villamil, M. L. Lemos, B. Novoa, y A. Figueras. 2005. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(1):98-104 p.
- Gromov, B. V., A. A. Vepitskiy, N. N. Titova, K. A. Mamkayeva y O. V. Alexandrova. 1991. Production of antibiotic cyanobacterin LU-1 by *Nostoc linckia* CALUC 892 (Cyanobacterium). *Journal of Applied Phycology*. 3:55-59 p.
- Guillard, R. R. L. y J. H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatom *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea*. *Canadian Journal of Microbiology*. 8:229-239 p.
- Guner, Y., O. Ozden, M. Altunok, E. Koru. 2004. Spawning and larvae production of common pandora, *Pagellus erythrinus*. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 56(33):209-216 p.
- Guzmán-Murillo, M. y F. Ascencio. 2000. Antiadhesive activity of sulphated exopolysaccharides of microalgae on attachment of red sore disease associated bacteria and *Helicobacter pylori* to tissue culture cells, *Letters in Applied Microbiology*. 12:273-476 p.

- Harder, R. y A. Opperman. 1953. Über antibiotische Stoffe bei den Grünalgen *Stichococcus bacillaris* and *Potosiphon botryoides*. *Archive Mikrobiology* 19:398-401 p.
- Hashimoto, Y. 1979. Marine toxins and other bioactive marine metabolites. Japan. Science Society Press, Tokio. 369 p.
- Hasuda, S y Y. Mito. 1966. An experimental use of *Chlorella* for a patient with incurable wound. *Shindan y Shinkayu*. 3:17-20 p.
- Hawke, J. P. 1976. A survey disease of striped bass *Morone saxatilis* and pompano *Trachinotus carolinus* culture in earthen ponds. *Proceeding of the Annual World Marine Society*. 7:495-509 p.
- Helms, G. L., R. E. Moore, W. P. Niemczura, G. M. L. Patterson, K. B. Tomer y M. L. Groos. 1988. Scytonemin A, a novel calcium antagonist from a blue-green algae. *Journal of Organic Chemistry*. 53:1298-1307 p.
- Hiroiyuki, N., A., Hideomi, A. Koichi, H. Shinziro y N. Kazutosi. 1989. Antitumor activity of polysaccharides and lipids from marine algae. *Nippon Suisan gakkaiishi*. 55(7):1265-1271 p.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley y S. T. Williams. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md. 1768 p.
- Hostettmann, K., M. Hostettmann y A. Marston. 1986. *Preparative Chromatography Techniques (Applications in Natural Product Isolation)*. Springer-Verlag. Berlin Alemania. 135 p.
- Iqbal, M., D. Grey, G. Sepan-Sarkissian y M. W. Fowler. 1993. Interactions between the unicellular red algae *Porphyridium cruentum* and associated bacteria. *European Journal of Phycology* 28:63-68 p.
- Ilhan, Z., T. Gülhan y A. Aksakal. 2006. *Aeromonas hydrophila* associated with ovine abortion *Small Ruminant Research* 61(1):73-78 p.
- Ishibashi, M., R. E. Moore, G. M. L. Patterson, C. Xu y J. Clardy. 1986. Scytophycins, cytotoxic and antimycotic agents from the cyanophyta *Scytonema pseudohofmanni*. *Journal of Organic Chemistry* 51:5300-5306 p.
- Ishida, K., H. Murakami y K Yamaguchi. 1997. Kawaguchipeptin B, an antibacterial cyclic undecapeptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Natural Products* 60:724-726 p.



- Iwata, T., H. Munekata, T. Inayama y T. Kato. 1990. Effect of *Spirulina platenses* on the blood pressure of rats. *Bulleting. Kagawa Nutrition University*. 21:63-70 p.
- Izquierdo, M., I. Forster, S. Divakaran, L. Conquest, O. Decamp y A Tacon. 2006. Effect of green and clear water and lipid source on survival, growth and biochemical composition of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* *Aquaculture Nutrition*. 12(3):192-202 p.
- Jensen, N. J. y J. L. Larsen. 1979. The ulcus-syndrome in cod *Gadus morhua*. En: *A pathological and histopathological study*. *Nord Veterinaesmed*. 31:222-228 p.
- Kato, T. 1991. Chemistry of microalgae and their application to food. *Food Chemistry*. 8:30-35 p.
- Kim, S., J. You-Jin, K. Won-Suk, B. Ho-Cheol, P. Pyo-Jam, B. Hee-Guk y B. Sungchul. 2001. Biochemical composition of marine microalgae and their potential antimicrobial activity. *Journal of Fisheries Sciences Technology* 4(2):75-83 p.
- Kittaka, J., K. Ono, J. Booth y W. Webber. 2005. Development of the red rock lobster, *Jasus edwardsii*, from egg to juvenile. *New Zeland of Marine an Freshwater Research*. 39:263-277 p.
- Lacoste, A, F. Jalabert, S. Malham, A. Cueff, F. Gelebart, C. Cordevant, M. Lange y S. A. Poulet. 2001. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Diseases of Aquatic Organisms*. 46(2):139-145 p.
- Lau, A. F., J. Siedlecki, J. Anleintner, G. M. L. Patterson, F. R. Caplan y R. E. Moore. 1993. Inhibition of reverse transcriptase activity by extract of cultured bluegreen algae (Cyanophyta). *Planta Medica* 59:148-151 p.
- Laycock, M. V., A. S. W. de Freitas y J. L. C. Wright. 1989. Glutamate agonist from marine algae. *Journal of Applied Phycology*. 1:113-122 p.
- Lubián, L. M., O. Montero, I. Moreno-Garrido, E. Huerta, C. Sobrino, M. G. Valle y G. Pares. 2000. *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. *Journal of Applied Phycology*. 12: 249-255 p.
- Mahakhant, A., P. Paungwong, V. Arunpairojana y P. Atthasampunna. 1998. Control of the plant pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* in mung bean by a microalgal extract. *Phycological Research*. 46:3-7 p.

- Marshall J. A., T. Ross, S. Pyecroft y G. Hallegraeff. 2005. Superoxide production by marine microalgae. *Marine Biology*. 147:541-549 p.
- McCadless, E. L. y J. S. Craigie. 1979. Sulfated polysaccharides in the red and brown algae. *Annual Review Plant Physiology*. 30:41-53 p.
- Mezrioui, N., B. Oudra, K. Oufdou, L. Hassani, M. Loudiki y J. Darley. 1994. Effect of microalgae growing on wastewater batch culture on *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* survival *Water Science and Technology*. 30(8):295–302.
- Mihelakakis, S., A., T. Yoshimatsu y C. Tsolkas. 2001. Spawning in captivity and early life history of cultured red porgy, *Pagrus pagrus*. *Aquaculture* 199:333-352 p.
- Miranda, B. A. 2004. La acuicultura y su entorno productivo, ambiental, socioeconómico y normativo. Departamento de Acuicultura, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Monografía 17239. Ensenada, Baja California. 140 p.
- Miyakoshi, M., M. Tanaka, K. Miyazawa, H. Nara, Y. Takemoto, T. Maki, S. Fukui, H. Yasutoko, K. Arayasu y K. Shimizu. 1980. Studies of *Chorella* IV. UIT special referente to hipertensión. *Kiso to Rinsho*. 14:191-200 p.
- Moore, R. E., G. M. L., Patterson, J. S. Myndrese, J. Jr. Barchi y T. R. Norton. 1986. Toxins from cyanophytas belonging to the Scytonemataceae. *Pure Applied Chemistry* 58:263-271 p.
- Moti, D., M. S. Sinyakov, E. Okun, M. Dym, B. Sredni y R. Avtalion. 2005. Experimental handling stress as infection-facilitating factor for the goldfish ulcerative disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 109(3-4):279-287 p.
- Murillo, O. D. 2001. Búsqueda de compuestos con actividad biomédica a partir de microalgas y fluido corporal de pescado. Tesis (Maestro en Ciencias). Departamento de Biotecnología Marina. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 70 p.
- Naviner, M., J. P. Bergé, P. Durand y H. Le Bris. 1999. Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. *Aquaculture*. 174:15-24 p.
- Ohta, S., Y. Shiomi, A. Kawashima, O. Aozasa, T. Nakao, T. Nagate, K. Kitamura y H. Miyata. 1995. Antibiotic effect of linoleic acid from *Chlorococcum* strain HS-101 and *Dunaliella primolecta* on methicillin-resistan *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Phycology*. 7:121-127 p.

- Olafsen, J. A. 2001. Interaction between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*. 200:223-247 p.
- Ördög, V., W. A. Stirk, R. Lenobel, M. Bancířová, M. Strnad, J. van Staden, J. Szigeti y L. Németh. 2004. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary. *Journal of Applied Phycology*. 16:309-314 p.
- Ozdemir, G., N. U. Karabay, M. C. Dalay y B. Pazarbasi. 2004. Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. *Phytotherapy Research*. 18:754-757 p.
- Papandroulakis, N., P. Divanach y Kentouri. 2002. Enhanced biological performance of intensive sea bream (*Sparus aurata*) larviculture in the presence of phytoplankton with long photophase. *Aquaculture* 204(1-2):45-63 p.
- Paster, Z. K. 1973. Pharmacology and mode of action of prymnesin. In: Martin, D. F. y G. M. Padilla. (eds.) *Cell biology: A Series of Monographs, Marine Pharmacognosy. Action of Marine Biotoxins at the Cellular Level*. Accademic Press, NY, NY. 730 p.
- Pesando, D. 1972. Etude chimique et strusturale d'une substance lipidique antibiotique produite par une diatomee marine : *Asteriorzella japorzica*. *Review international Oceanography Medica*. 25:49-68 p.
- Pratt, R., T. C. Daniels, J. J. Eiler, J. B. Gunnison, W. D. Kumler, J. F. Oneto, L. A. Strait, H. A. Spoehr, G. J. Hardin, H. W. Milner, J. H. Smith y H. Strain. 1944. Chlorellin, an antibacterial substance from *Chlorella*. *Science*. 99(2):351-352 p.
- Pujalte, M. J., A. Sitja-Bobadilla, P. Alvarez-Pellitero y E. Garay. 2003. Carriage of potentially fish-pathogenic bacteria in *Sparus aurata* cultured in Mediterranean fish farms. *Diseases of Aquatic Organisms*. 54(2):119-126 p.
- Pushparaj, B., E. Pelosi y F. Jüttner. 1999. Toxicological analysis of the marine cyanobacterium *Nodularia harveyana*. *Journal of Applied Phycology*. 10:527-530 p.
- Riquelme, E. C. y R. E. Avedaño-Herrera. 2003. Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural*. 76(4):725-736 p.
- Saito, T., A. Saito, y N. Oka. 1966. Clinical application of *Chlorella dosage*. *Shindan to Shinyaku*. 3:61-64 p.

- Schwart, R. E., C. F. Hirsch, D. F. Sestin, J. E. Flor, M. Chartrain, R. E. Fromtling, H. Guy, M. Harris, J. Salvatore, M. Liesch y K. Yudin. 1990. Pharmaceuticals from cultured algae. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 5:2-3 p.
- Sevillano, L., A. Arenas, A. Mazon, J. Baztan J y J. Vera. 1990. La infección por *Aeromas hydrophila* como complicación de una fractura abierta de fémur. *Revista de Ortopedia y Traumatología*. 34(3):303-307 p.
- Sharma, G. M., L. Michaels y P. R. Burkholder. 1968. Gonodomin, a new antibiotic from dinoflagellate. *Journal of Antibiotics*. 21(11):659-664 p.
- Sieburth, J. M. 1959. Acrylic acid, an "antibiotic" principle in *Phaeocystis* blooms in Antarctic waters. *Science* 132:676-677 p.
- Silva, A. 1998. Improvement of the production of *Paralichthys adspersus* larvae through the "green water" technique. *Aquaculture '98 Book of Abstracts*. 494 p.
- Sindermann, C. J. 1990a. Principal diseases of marine fish and shellfish. Volume 1. Diseases of marine fish. Second edition. Academic Press, San Diego, CA. (USA). 521 p.
- Sindermann, C. J. 1990b. Principal diseases of marine fish and shellfish. Volume 2. Diseases of marine shellfish. Second edition. Academic Press, San Diego, CA. (USA). 521 p.
- Skjermo, J y O. Vadstein. 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture*. 177:333-343 p.
- Skiftesvik, A. B., H. I. Browman y F. F. St-Pierre. 2003. Life in *green water*: the effect of microalgae on the behavior of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. The Big Fish Bang. Proceedings of the 26th Annual Larval Fish Conference. 97-103 p.
- Skulberg, O. M. 2000. Microalgae as a source of bioactive molecules experience from cyanophyte research. *Journal of Applied Phycology*. 12:341-348 p.
- Sonoda, M. 1972. Effect of *Chorella* extract of pregnancy anemia. *Japan Journal of Nutrition*. 30:218-225 p.
- Sonoda, M. y M. Okuda. 1978. Effect of *Chorella* of neurosis at puberty. *Shindan to Shinyaku*. 15:85-88 p.
- Stottrup, J. G., K. Gravningen y N. H. Norsker. 1995. The role of different algae in the growth and survival of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) in

- intensive rearing systems. ICES marine science symposia. Copenhagen. 201:173-186 p.
- Sugumar, G., T. Nakai, Y. Hirata, D. Matsubara y K. Muroga. 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster. *Diseases Aquatic Organism*. 33(2):111-118 p.
- Sukenik, A., Y. Carmeli y T. Berner. 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Journal of Phycology*. 25:686-692 p.
- Sukenik, A. y Y. Carmeli. 1990. Lipid synthesis and fatty acid composition in *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) grown in a light-dark cycle. *Journal of Phycology*, 26:463-469 p.
- Talyshinsky, M., Y. Souprun y M. Huleihel. 2000. Antiviral activity of red microalgal polysaccharides against retroviruses. *Cancer cell International*. 13:2-8 p.
- Tanaka, K., F. Konishi, K. H. Taniguchi y K. Nomoto. 1984. Aumentation of antitumor resistance by a strain of unicellular green algae *Chlorella vulgaris*. *Cancer Immunol. Immunother*. 17:90-94 p.
- Taylor, R. F., M. Ikawa, J. J. Sasner, F. P. Thurberg y K. K. Andersen. 1974. Ocurrance of choline esters in the marine dinoflagellate *Amphidinium carteri*. *Journal of Phycology*. 10: 279-283 p.
- Tendencia, E. y M. de la Peña. 2003. Investigation of some components of the green water system which makes it effective in the initial control of luminous bacteria. *Aquaculture*. 218(1-4):115-119 p.
- Tendencia, T., M. de la Peña, A. Fermin, G. Lio-Po, C. Choresca Jr. y Y. Inui. 2003. Antibacterial activity of tilapia *Tilapia hornorum* against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*. 232(1-4):145-152 p.
- Tokuyaso, M. 1983. Examples of diets for infants and childrens nutritional guidance and their effects. *Japan Journal of Nutrition*. 41:273-283 p.
- Thompson, R., H. L. Macpherson, A. Riaza y T. H. Birkbeck. 2005. *Vibrio splendidus* biotype 1 as a cause of mortalities in hatchery-reared larval turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Applied Microbiology*. 99(2):243-250 p.
- Torres-Ariño. A. 2001. Aislamiento y caracterización de cianobacterias marinas productoras de compuestos de interés biomédico. Tesis (Maestro en

- Ciencias). Departamento de Biotecnología Marina. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 85 p.
- Utkilen, H. y N. Gjolme. 1992. Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. *Applied Environment Microbiology*. 49:1321-1325 p.
- Van Den Hoek, C., D. G., Mann, H. M., Jahns, 1995. *Algae. An introduction to phycology*, Cambridge University Press, Great Britain. 623 p.
- Volk, R. B. 2005. Screening of microalgal culture media for the presence of algicidal compounds and isolation and identification of two bioactive metabolites, excreted by the cyanobacteria *Nostoc insulare* and *Nodularia harveyana*. *Journal of Applied Phycology*. 17:339-347 p.
- Vásquez-Yeomans, R., J. Cáceres y M. García. 2004. Bacterias aisladas de las branquias del ostión japonés *Cassostrea gigas* cultivado en Bahía Falsa, Baja California, México. *Anales del Instituto de Biología*. 75(2):237-243.
- Wen-hui, F. y H. Jie. 2005. Identification and phylogenetic study of pathogenic bacteria causing ulcer disease of cultured Turbot (*Scophthalmus maximus*). *Weishengwu Xuebao*. 45(5):665-670 p.