

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



Maestría en Ciencias en Acuicultura

Efecto inhibitorio de dos especies de diatomeas contra *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Juan Carlos Ayala García

Ensenada, Baja California, México
2021

Tesis defendida por

Juan Carlos Ayala García

y aprobada por el siguiente comité

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra

Directora de tesis

Miembros del comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez

Dra. Ceres Anabel Molina Cárdenas

Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida



Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz

Coordinadora de Posgrado en Acuicultura

Dr. Pedro Negrete Regagnon

Director de Estudios de Posgrados

Juan Carlos Ayala García © 2021

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Juan Carlos Ayala García** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura

Efecto inhibitorio de dos especies de diatomeas contra *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*

Resumen aprobado por:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Directora de tesis

La acuicultura es una de las principales áreas que soportan la producción de alimento para consumo humano. Sin embargo, los cultivos pueden verse afectados por la presencia de bacterias patógenas entre las que destacan las del género *Vibrio*, las cuáles pueden ocasionar pérdidas totales en los cultivos. Por ello, es necesario contar con métodos eficaces que permitan controlar las bacterias tipo *Vibrio* en los sistemas de cultivo. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto inhibitorio de las diatomeas *Nitzschia thermalis* f. *kurta* y *Navicula* cf. *subinflatooides* contra las bacterias patógenas de importancia acuícola, a saber, *Vibrio campbellii*, *V. alginolyticus* y *V. harveyi*. Para cumplir el objetivo, se realizaron retos de inhibición, para lo que se emplearon cultivos mono-específicos, no axénicos y por triplicado en medio "f" a una densidad inicial de 1×10^5 células mL^{-1} para cada especie de diatomea. Los cultivos se inocularon con una concentración inicial de 1×10^2 *Vibrio* mL^{-1} para cada especie *Vibrio* spp. de manera individual. Como tratamientos control, se utilizaron para cada especie de diatomea cultivos en similares condiciones a las antes descritas, pero sin la adición de *Vibrio* y cultivos de cada especie de *Vibrio* en medio "f" sin células de diatomeas. Los tratamientos fueron analizados durante las fases exponencial y estacionaria del crecimiento, para evaluar la densidad celular de las diatomeas, conteo de bacterias heterotróficas y cuantificación de la densidad de *Vibrio* spp. Para cada tratamiento experimental, se tomaron volúmenes apropiados para evaluar el peso seco, composición proximal, pigmentos, fotosíntesis y perfil de ácidos grasos. Se evaluaron diferencias significativas en el crecimiento de *N. subinflatooides* y *N. thermalis* al ser cocultivadas con las tres especies de *Vibrio* spp. ($p < 0.05$). *N. subinflatooides* y *N. thermalis* inhiben el crecimiento de las tres especies de *Vibrio* durante la fase exponencial de crecimiento. Se evaluaron diferencias significativas en la concentración de las tres especies de *Vibrio* con respecto al tiempo ($p < 0.05$). El contenido de bacterias heterotróficas se presentó en todos los tratamientos en el orden de 10^6 y 10^7 UFC mL^{-1} , lo que muestra que el efecto inhibitorio de las diatomeas es selectivo para las tres especies de *Vibrio* evaluadas. El peso seco orgánico presentó diferencias significativas por la adición de las tres especies de *Vibrio* spp. durante la fase exponencial ($p < 0.05$) de *N. subinflatooides*. La presencia de las tres especies de *Vibrio* spp. mostró diferencias significativas en la composición proximal de *N. subinflatooides* y *N. thermalis* durante las fases de crecimiento exponencial y estacionaria ($p < 0.05$). El contenido de clorofila c y carotenos mostraron diferencias significativas para *N. subinflatooides* y *N. thermalis* durante ambas fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de la adición de las tres especies de *Vibrio* spp. La tasa de transporte de electrones (ETR) y la irradiancia de saturación (E_k) presentaron diferencias significativas para *N. subinflatooides* y *N. thermalis* durante ambas fases de crecimiento ($p < 0.05$) por la adición de las tres especies de *Vibrio* spp. La composición de ácidos grasos de *N. subinflatooides* presentó cambios por la adición de las tres especies de *Vibrio* spp. El contenido total de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) disminuyó en los tratamientos con las tres especies de *Vibrio* spp., mientras que, para *N. thermalis* el contenido total de PUFAs aumentó por la adición de las tres especies de *Vibrio* spp.

Palabras clave: Acuicultura, diatomeas, *Vibrio*, efecto inhibitorio, *Navicula subinflatooides*, *Nitzschia thermalis* composición bioquímica, fotosíntesis, composición de ácidos grasos.

Abstract of the thesis present by **Juan Carlos Ayala García** as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Aquaculture.

Inhibitory effect of two diatom species against *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, and *V. campbellii*

Abstract approved by:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Thesis Director

Aquaculture is one of the main areas that support the production of food for human consumption. However, crops can be affected by pathogenic bacteria, among which those of the genus *Vibrio* stand out and can cause total losses in the crops. Therefore, it is necessary to have effective control methods that allow controlling *Vibrio*-type bacteria in culture systems. The objective of this work was to evaluate the inhibitory effect of the diatoms *Nitzschia thermalis* f. *kurta* and *Navicula* cf. *subinflatooides* against pathogenic bacteria of aquaculture importance, namely, *Vibrio campbellii*, *V. alginolyticus*, and *V. harveyi*. To achieve the objective, inhibition challenges were performed, for which monospecific, non-axenic, and triplicate cultures were used in medium "f" an initial density of 1×10^5 cells mL^{-1} for each diatom species. The cultures were inoculated with an initial concentration of 1×10^2 *Vibrio* mL^{-1} for each *Vibrio* spp. individually. As a control treatment, cultures under similar conditions to those described above, but without the addition of *Vibrio*, were used for each diatom species and cultures of each *Vibrio* species in "f" medium without diatom cells. The treatments were analyzed during the exponential and stationary phases of growth to evaluate the cell density of diatoms, heterotrophic bacteria count, and quantification of the density of *Vibrio* spp. For each experimental treatment, they were taken necessary to evaluate the dry weight, proximal composition, pigments, photosynthesis, and fatty acid profile. Significant differences in the growth of *N. subinflatooides* and *N. thermalis* were evaluated when cocultivated with the three *Vibrio* spp. species ($p < 0.05$). *N. subinflatooides* and *N. thermalis* inhibit the growth of three *Vibrio* species during the exponential phase of growth. Significant differences were evaluated in the concentration of the three *Vibrio* species with respect to time ($p < 0.05$). The content of heterotrophic bacteria was presented in all treatments in the order of 10^6 and 10^7 CFU ml^{-1} , which shows the inhibitory effect of diatoms is selective for the three *Vibrio* species evaluated. The organic dry weight showed significant differences due to the addition of *Vibrio* spp. during the exponential phase ($p < 0.05$) of *N. subinflatooides*. The presence of the three *Vibrio* spp. species showed significant differences in the proximal composition of *N. subinflatooides* and *N. thermalis* during the exponential and stationary growth phases ($p < 0.05$). The content of chlorophyll c and carotenes showed significant differences for *N. subinflatooides* and *N. thermalis* during both growth phases ($p < 0.05$) due to the addition of the three *Vibrio* spp. species. The electron transport rate (ETR) and saturation irradiance (E_k) showed significant differences for *N. subinflatooides* and *N. thermalis* during both growth phases ($p < 0.05$) due to the addition of the three *Vibrio* spp. species. The fatty acid composition of *N. subinflatooides* showed changes due to the addition of *Vibrio* spp. and the content of total polyunsaturated fatty acids (PUFA) decreased in the treatments with with the three *Vibrio* spp. species while, for *N. thermalis*, the total content of PUFAs increased due to the addition of the three *Vibrio* spp. species.

Keywords: Aquaculture, diatoms, *Vibrio*, inhibitory effect, *Navicula subinflatooides*, *Nitzschia thermalis*, biochemical composition, photosynthesis, fatty acid composition.

Dedicatoria

A mis padres por su apoyo incondicional en todo momento.

A mis más grandes amores: Melissa y Dulce Isabella♠.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE) y al Departamento de Acuicultura por brindarme una excelente formación académica y permitirme hacer uso de infraestructura durante la realización de mi maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para estudios de posgrados con número de becario 19214463.

Al apoyo económico para la realización de la parte experimental del proyecto de tesis obtenido por medio del FIDEICOMISO del CICESE cuenta 623801 y del proyecto con recursos fiscales cuenta interna del CICESE 623108.

A la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra por permitirme formar parte de su gran grupo de investigación, por compartir conmigo su conocimiento y siempre hacerse un tiempo para motivarme, brindarme su atención y resolver cualquier duda que surgiera. Pero sobre todo por ser tan excelente persona y siempre aconsejarme no solamente en el ámbito científico sino también en lo personal.

A mis sinodales, la Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez, la Dra. Ceres Anabel Molina Cárdenas y el Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida por sus consejos y observaciones que enriquecieron de gran manera este proyecto.

Al Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida por propocionarme las cepas de bacterias empleadas en este estudio y permitirme trabajar en el laboratorio que está a su cargo.

A la Dra. Ceres Anabel Molina Cárdenas por sus entrenamientos para el uso de los equipos, por compartirme su conocimiento y por emocionarse conmigo cuando le mostraba los resultados de inhibición.

A la M. en C. Fátima Castro Ochoa por asesorarme durante el desarrollo de las distintas técnicas y metodologías para el desarrollo de la tesis. Por sus asesorías para el manejo de datos y por los momentos vividos en el laboratorio durante esta etapa.

Al Dr. David A. Siqueiros Beltrones por su apoyo para la identificación de las especies de diatomeas utilizadas en este proyecto.

A la Dra. Martha Gómez-Chiarri y la Dra. Ivon Gifard quienes aislaron y donaron las cepas de bacterias empleadas en este estudio.

A todos mis profesores por sus conocimientos compartidos en cada uno de los cursos impartidos.

A Dalila Mercado por ser tan servicial y regalarme dulces.

A mis compañeros de generación por los momentos vividos durante esta etapa. En especial a Marco y Ramiro, con quienes estudiaba, jugaba futbol y cocinaba (o pedíamos comida).

A mis padres Carmen y Jesús por su apoyo incondicional y por siempre confiar en mí. Estoy seguro de que sin ustedes esto no sería posible.

A mi hija Dulce Isabella desde tu llegada el tiempo para leer artículos y procesar datos no ha sido el mismo, pero nada se compara con la felicidad que ha traído tu llegada. Te amo.

A mis hermanos Jesús, Carmen y Víctor por su apoyo durante esta etapa. En especial a Víctor, por siempre ayudarme (desde la licenciatura) y resolver siempre mis dudas, eres mi ejemplo a seguir.

A Dulce, Lenin y Ángel por su amistad y seguir en contacto a pesar de haber tomado caminos distintos.

A Melissa por ser mi compañera en esta aventura y en la vida. Por escucharme una y otra vez previo a una exposición, por explicarme cuando no entendía algo y por alentarme a siempre salir adelante. Eres la mejor, TE AMO.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xviii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	3
1.2 Justificación.....	13
1.3 Hipótesis.....	14
1.4 Objetivos.....	14
1.4.1 Objetivo general	14
1.4.2 Objetivos específicos.....	15
Capítulo 2. Metodología.....	16
2.1 Origen de las cepas de diatomeas.....	16
2.2 Mantenimiento de cepas y cultivos de diatomeas.....	16
2.3 Caracterización de las curvas de crecimiento de las diatomeas.....	17
2.4 Cultivo de <i>Vibrio</i>	18
2.5 Preparación de inóculos de bacterias.....	18
2.6 Conteo de bacterias.....	19
2.7 Retos de inhibición del crecimiento de <i>Vibrio</i>	20
2.8 Medición de células.....	21
2.9 Evaluación del peso seco de las diatomeas <i>N. subinflatooides</i> y <i>N. thermalis</i>	21
2.9.1 Peso seco.....	21
2.10 Extracción y cuantificación de pigmentos.....	22
2.11 Medición de Fotosíntesis.....	23
2.12 Composición proximal de las diatomeas <i>N. subinflatooides</i> y <i>N. thermalis</i>	23
2.12.1 Contenido de lípidos.....	23
2.12.2 Contenido de carbohidratos	24

2.12.3 Contenido de proteínas.....	24
2.13 Composición de ácidos grasos.....	24
2.14 Tratamiento estadístico de los resultados.....	25
Capítulo 3. Resultados.....	26
3.1 Caracterización de la curva de crecimiento de <i>N. subinflatooides</i>	26
3.2 Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio</i> spp. por <i>N. subinflatooides</i>	27
3.2.1 Crecimiento de <i>N. subinflatooides</i> en cocultivo con <i>Vibrio</i> spp.....	27
3.2.2 Efecto inhibitorio de <i>N. subinflatooides</i> contra <i>Vibrio</i> spp.....	29
3.2.3 Peso seco total, contenido de cenizas y peso seco orgánico de <i>N. subinflatooides</i>	33
3.2.4 Composición proximal de <i>N. subinflatooides</i>	36
3.2.5 Cuantificación de pigmentos de <i>N. subinflatooides</i>	38
3.2.6 Parámetros fotosintéticos de <i>N. subinflatooides</i>	41
3.2.7 Composición de ácidos grasos de <i>N. subinflatooides</i>	46
3.3 Caracterización de la curva de crecimiento de <i>N. thermalis</i>	47
3.4 Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio</i> spp. por <i>N. thermalis</i>	48
3.4.1 Crecimiento de <i>N. thermalis</i> en cocultivo con <i>Vibrio</i> spp.....	48
3.4.2 Efecto inhibitorio de <i>N. thermalis</i> contra <i>Vibrio</i> spp.....	50
3.4.3 Peso seco total, contenido de cenizas y peso seco orgánico de <i>N. thermalis</i>	54
3.4.4 Composición proximal de <i>N. thermalis</i>	57
3.4.5 Cuantificación de pigmentos de <i>N. thermalis</i>	59
3.4.6 Parámetros fotosintéticos de <i>N. thermalis</i>	62
3.4.7 Composición de ácidos grasos de <i>N. thermalis</i>	66
Capítulo 4. Discusión.....	68
4.1 Crecimiento.....	68
4.2 Efecto inhibitorio.....	69
4.3 Crecimiento de las diatomeas en cocultivo con <i>Vibrio</i> spp.....	74
4.4 Peso seco.....	75
4.5 Composición proximal.....	76
4.6 Pigmentos.....	79
4.7 parámetros fotosintéticos.....	81
4.8 Composición de ácidos grasos.....	83

Capítulo 5. Conclusiones.....	88
Capítulo 6. Recomendaciones.....	90
Literatura citada.....	91
Anexos.....	104

Lista de figuras

Figura	Página	
1	Posibles mecanismos celulares de la acción antibacteriana de los ácidos grasos libres. A) La disrupción de la cadena transportadora de electrones y la interferencia de la fosforilación oxidativa en las bacterias debido a los ácidos grasos pueden afectar la producción de energía. B) Los ácidos grasos podrían provocar la fuga de metabolitos de la célula bacteriana, lisis celular y autólisis. A su vez, podrían causar la inhibición de las enzimas de membrana y citosólicas (C), incluidas las necesarias para síntesis de ácidos grasos (D). E) También pueden afectar la absorción activa de nutrientes actuando directamente sobre la proteína de transporte o como resultado indirecto de la incapacidad de la célula bacteriana para producir ATP. F) Los productos de peroxidación de los ácidos grasos pueden presentar efectos nocivos sobre la célula bacteriana y desempeñar un papel en la destrucción celular. Tomada y modificada de Desbois y Smith (2010).....	10
2	Caracterización del crecimiento de <i>Navicula subinflatoides</i> A) Conteos celulares; B) Densidad óptica; C) pH. Los datos muestran los valores promedio (n=3) y desviación estándar.....	26
3	Curvas de crecimiento de <i>Navicula subinflatoides</i> A) conteos celulares; B) Densidad óptica. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de <i>N. subinflatoides</i> en presencia o ausencia de <i>Vibrio</i> spp. <i>N. subinflatoides</i> (■), <i>N. subinflatoides</i> + <i>V. harveyi</i> (●), <i>N. subinflatoides</i> + <i>V. alginolyticus</i> (▲), <i>N. subinflatoides</i> + <i>V. campbellii</i> (▼)	28
4	Reto de inhibición de <i>Navicula subinflatoides</i> contra <i>Vibrio harveyi</i> . Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: <i>V. harveyi</i> (<i>Vibrio</i> mL ⁻¹ : (▲), <i>V. harveyi</i> en tratamiento control (<i>Vibrio</i> mL ⁻¹ : (★) y bacterias heterotróficas (UFC mL ⁻¹) (●) cocultivadas con <i>N. subinflatoides</i> (cél mL ⁻¹) (■)). Análisis de varianza de una vía y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d.....	30
5	Reto de inhibición de <i>Navicula subinflatoides</i> contra <i>Vibrio alginolyticus</i> . Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: <i>V. alginolyticus</i> (<i>Vibrio</i> mL ⁻¹ : (▲), <i>V. alginolyticus</i> en tratamiento control (<i>Vibrio</i> mL ⁻¹ : (★) y bacterias heterotróficas (UFC mL ⁻¹) (●) cocultivadas con <i>N. subinflatoides</i> (cél mL ⁻¹) (■)). Análisis de varianza de una vía y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d>e...	31
6	Reto de inhibición de <i>Navicula subinflatoides</i> contra <i>Vibrio campbellii</i> . Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: <i>V. campbellii</i> (<i>Vibrio</i> mL ⁻¹ : (▲), <i>V. campbellii</i> en tratamiento control (<i>Vibrio</i> mL ⁻¹ : (★) y bacterias heterotróficas (UFC mL ⁻¹) (●) cocultivadas con <i>N. subinflatoides</i> (cél mL ⁻¹) (■)). Análisis de varianza de una vía y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d>e.....	32

- 7 Valores promedio y desviación estándar del peso seco total de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 34
- 8 Valores promedio y desviación estándar del contenido de cenizas de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 35
- 9 Valores promedio y desviación estándar del peso seco orgánico de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 35
- 10 Valores promedio y desviación estándar del contenido de carbohidratos de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 37
- 11 Valores promedio y desviación estándar del contenido de lípidos de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d>e>f. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 37
- 12 Valores promedio y desviación estándar del contenido de proteínas de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 38
- 13 Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila a (Chl-a) de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 40

- 14 Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila c (Chl-c) de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 40
- 15 Valores promedio y desviación estándar del contenido de carotenos (car) de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 41
- 16 Valores promedio y desviación estándar de la pendiente inicial de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 43
- 17 Valores promedio y desviación estándar de la tasa de transporte de electrones de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 44
- 18 Valores promedio y desviación estándar de la irradiancia de saturación de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d>e>f. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 44
- 19 Valores promedio y desviación estándar de la eficiencia cuántica de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 45
- 20 Curvas fotosintéticas medidas como tasa máxima de transporte de electrones de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria de crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B. *N. subinflatooides* (●), *N. subinflatooides* + *V. harveyi* (▼), *N. subinflatooides* + *V. alginolyticus* (○), *N. subinflatooides* + *V. campbellii* (△)..... 45

21	Caracterización del crecimiento de <i>Nitzschia thermalis</i> A) Conteos celulares; B) Densidad óptica; C) pH. Los datos muestran los valores promedio (n=3) y desviación estándar.....	48
22	Curvas de crecimiento de <i>Nitzschia thermalis</i> A) conteos celulares; B) Densidad óptica. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de <i>N. subinflatooides</i> en presencia o ausencia de <i>Vibrio</i> spp. <i>N. thermalis</i> (■), <i>N. thermalis</i> + <i>V. harveyi</i> (●), <i>N. thermalis</i> + <i>V. alginolyticus</i> (▲), <i>N. thermalis</i> + <i>V. campbellii</i> (▼).....	49
23	Reto de inhibición de <i>Nitzschia thermalis</i> contra <i>V. harveyi</i> . Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: <i>V. harveyi</i> (<i>Vibrio</i> mL ⁻¹ : (▲), <i>V. harveyi</i> en tratamiento control (<i>Vibrio</i> mL ⁻¹ : (★) y bacterias heterotróficas (UFC mL ⁻¹) (●) cocultivadas con <i>N. thermalis</i> (cél mL ⁻¹) (■)). Análisis de varianza de una vía y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d>e>f>g>h.....	51
24	Reto de inhibición de <i>Nitzschia thermalis</i> contra <i>V. alginolyticus</i> . Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: <i>V. alginolyticus</i> (<i>Vibrio</i> mL ⁻¹ : (▲), <i>V. alginolyticus</i> en tratamiento control (<i>Vibrio</i> mL ⁻¹ : (★) y bacterias heterotróficas (UFC mL ⁻¹) (●) cocultivadas con <i>N. thermalis</i> (cél mL ⁻¹) (■)). Análisis de varianza de una vía y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d>e>f>g.....	52
25	Reto de inhibición de <i>Nitzschia thermalis</i> contra <i>V. campbellii</i> . Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: <i>V. campbellii</i> (<i>Vibrio</i> mL ⁻¹ : (▲), <i>V. campbellii</i> (<i>Vibrio</i> mL ⁻¹ : (★) y bacterias heterotróficas (UFC mL ⁻¹) (●) cocultivadas con <i>N. thermalis</i> (cél mL ⁻¹) (■)). Análisis de varianza de una vía y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d>e>f>g.....	53
26	Cultivo de bacterias heterotróficas. A) bacterias provenientes del cocultivo con <i>Vibrio campbellii</i> ; B) bacterias provenientes del cocultivo con <i>V. alginolyticus</i> . Muestras tomadas a las 24 h de los ensayos de inhibición.....	54
27	Valores promedio y desviación estándar del peso seco de <i>Nitzschia thermalis</i> en presencia o ausencia de <i>Vibrio</i> spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B.....	55
28	Valores promedio y desviación estándar del contenido de cenizas de <i>Nitzschia thermalis</i> en presencia o ausencia de <i>Vibrio</i> spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B...	56

- 29 Valores promedio y desviación estándar del peso seco orgánico de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 56
- 30 Valores promedio y desviación estándar del contenido de carbohidratos de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 58
- 31 Valores promedio y desviación estándar del contenido de lípidos de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d>e>f>g>h. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 58
- 32 Valores promedio y desviación estándar del contenido de proteínas de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 59
- 33 Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila a (Chl-a) de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 61
- 34 Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila c (Chl-c) de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 61
- 35 Valores promedio y desviación estándar del contenido de carotenos (car) de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b.>c>d. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 62

- 36 Valores promedio y desviación estándar de la pendiente inicial de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 64
- 37 Valores promedio y desviación estándar de la tasa de transporte de electrones de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 64
- 38 Valores promedio y desviación estándar de la irradiancia de saturación de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 65
- 39 Valores promedio y desviación estándar de la eficiencia cuántica de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B..... 65
- 40 Curvas fotosintéticas medidas como tasa máxima de transporte de electrones de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria de crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B. *N. thermalis* (●), *N. thermalis* + *V. harveyi* (▼), *N. thermalis* + *V. alginolyticus* (○), *N. thermalis* + *V. campbellii* (△)..... 66
- 41 Diagrama general de los posibles mecanismos de inhibición de las diatomeas contra *Vibrio* spp. Las microalgas producen exopolisacaridos (EPS) bajo condiciones de estrés (presencia de compuestos alguicidas o competencia por nutrientes). Los ácidos grasos saturados son liberados en bajas concentraciones ocasionando la disrupción de la percepción del quórum. Durante la lisis celular de las diatomeas, se liberan al medio metabolitos como los EPS y ácidos grasos que inhiben el crecimiento de *Vibrio* spp. (*Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*). Flechas punteadas indican los posibles mecanismos de inhibición. Flechas con línea continua indican el posible mecanismo de disrupción de la percepción del quórum. EPS: Exopolisacáridos; SFA: ácidos grasos saturados; C10:0: ácido cáprico; C12:0: ácido láurico. Figura realizada en BioRender..... 71

- 42 Imágenes de las diatomeas empleadas en este estudio. Paneles a-b corresponden a la diatomea *Navicula* cf. *subinflatooides*; paneles c-d corresponden a *Nitzschia thermalis* f. *kurta*. Imágenes tomadas por Molina-Cárdenas, (2021)..... 104
- 43 Reto de inhibición de *Navicula subinflatooides* contra *Vibrio harveyi*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: *V. harveyi* (*Vibrio* mL-1: (▲), *V. harveyi* en tratamiento control (*Vibrio* mL-1: (★) y bacterias heterotróficas (UFC mL-1) (●) cocultivadas con *N. subinflatooides* (cél mL) (■)). Filtrado de 1 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba a posteriori de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b. 104
- 44 Reto de inhibición de *Navicula subinflatooides* contra *Vibrio alginolyticus*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: *V. alginolyticus* (*Vibrio* mL-1: (▲), *V. alginolyticus* en tratamiento control (*Vibrio* mL-1: (★) y bacterias heterotróficas (UFC mL-1) (●) cocultivadas con *N. subinflatooides* (cél mL-1) (■)). Filtrado de 1 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba a posteriori de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b..... 105
- 45 Reto de inhibición de *Navicula subinflatooides* contra *Vibrio campbellii*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: *V. campbellii* (*Vibrio* mL-1: (▲), *V. campbellii* en tratamiento control (*Vibrio* mL-1: (★) y bacterias heterotróficas (UFC mL-1) (●) cocultivadas con *N. subinflatooides* (cél mL-1) (■)). Filtrado de 1 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba a posteriori de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c..... 105
- 46 Composición de ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp..... 106
- 47 Reto de inhibición de *Nitzschia thermalis* contra *V. harveyi*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: *V. harveyi* (*Vibrio* mL-1: (▲), *V. harveyi* en tratamiento control (*Vibrio* mL -1: (★) y bacterias heterotróficas (UFC mL-1) (●) cocultivadas con *N. thermalis* (cél mL-1) (■)). Filtrado de 1 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba a posteriori de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b..... 106

- 48 Reto de inhibición de *Nitzschia thermalis* contra *V. alginolyticus*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: *V. alginolyticus* (*Vibrio* mL-1: (▲), *V. alginolyticus* en tratamiento control (*Vibrio* mL-1: (★) y bacterias heterotróficas (UFC mL-1) (●) cocultivadas con *N. thermalis* (cél mL-1) (■)). Filtrado de 1 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba a posteriori de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c..... 107
- 49 Reto de inhibición de *Nitzschia thermalis* contra *V. campbellii*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: *V. campbellii* (*Vibrio* mL-1: (▲), *V. campbellii* en tratamiento control (*Vibrio* mL -1: (★) y bacterias heterotróficas (UFC mL-1) (●) cocultivadas con *N. thermalis* (cél mL-1) (■)). Filtrado de 1 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba a posteriori de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b..... 107
- 50 Composición de ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp..... 108

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Dosis y duración de terapia de los principales antibióticos usados en acuicultura.....	7
2	Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento en fase exponencial, tasa de generación y tamaño celular de <i>Navicula subinflatooides</i> en presencia o ausencia de <i>Vibrio</i> spp.....	29
3	Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de ácidos grasos de <i>Navicula subinflatooides</i> en presencia o ausencia de <i>Vibrio</i> spp. en fase estacionaria de crecimiento.....	46
4	Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento en fase exponencial, tasa de generación y tamaño celular de <i>Nitzschia thermalis</i> en presencia o ausencia de <i>Vibrio</i> spp.....	50
5	Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de ácidos grasos de <i>Nitzschia thermalis</i> en presencia o ausencia de <i>Vibrio</i> spp. en fase estacionaria de crecimiento..	67

Capítulo 1. Introducción

Los niveles de producción de especies acuáticas mediante la pesca tradicional han alcanzado sus niveles máximos sostenibles (FAO, 2020). Esto ha provocado que la acuicultura se convierta en un área fundamental dentro del sector primario para la producción de alimentos (Platas-Rosado y Vilaboa-Arroniz, 2014; FAO, 2020). De acuerdo con lo publicado por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, por sus siglas en inglés), en el año 2018 la acuicultura alcanzó la cifra de 179 millones de toneladas de producción total mundial, en donde la mayoría de estas toneladas fueron destinadas al consumo humano directo (FAO, 2020). Por ello, la acuicultura es considerada un área clave para combatir los problemas de suministro de alimentos en el mundo, se estima que para el año 2030, será necesario que la acuicultura produzca aproximadamente 40 millones de toneladas más, que permitan mantener los niveles de consumo actual y hacer frente al constante crecimiento de la población (Rueda-González, 2011; FAO, 2020).

Sin embargo, como en cualquier industria de producción animal, la acuicultura se ha visto severamente afectada por la aparición de enfermedades ocasionadas por microorganismos patógenos como: virus, hongos, protozoarios y bacterias (FAO, 2011). Dentro de este último grupo se encuentran las bacterias del género *Vibrio*, las cuales han sido asociadas con la aparición de enfermedades en especies de importancia económica para la acuicultura tales como: el salmón (*Salmo salar*) (Bjelland *et al.*, 2012), la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Austin *et al.*, 2005), la tilapia del nilo (*Oreochromis niloticus*) (Chatterjee y Haldar, 2012), el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), el langostino tigre (*Penaeus monodon*) (Haldar *et al.*, 2011), el mejillón del mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) (Anguiano-Beltrán *et al.*, 2004) y distintas especies de abulón (Nicolas *et al.*, 2002).

La aparición de enfermedades infecciosas en los cultivos acuícolas puede ocasionar numerosas pérdidas económicas, principalmente asociadas a gastos relacionados con el costo de los tratamientos y la disminución de la producción, en donde en algunas ocasiones las pérdidas de los cultivos pueden ser totales (Blanco *et al.*, 2004).

Debido al riesgo que representa la aparición de enfermedades infecciosas en la acuicultura, es de suma importancia aplicar medidas profilácticas entre las que se encuentran: mantener la calidad del

agua, tener buenos manejos de los cultivos y evitar la aparición de estrés en los organismos acuáticos, estas medidas pueden ayudar a disminuir la aparición de las enfermedades infecciosas (USDA, 2011). Si este tipo de enfermedades llegan a aparecer en los cultivos es fundamental que se cuente con los métodos adecuados que permitan controlar de manera rápida y eficiente la proliferación de los microorganismos patógenos causantes de estas enfermedades.

En la actualidad, el uso de antibióticos es el principal método empleado para controlar la aparición de enfermedades infecciosas en los cultivos acuícolas; sin embargo, en ocasiones estas sustancias químicas son utilizadas de manera inadecuada al ser empleadas como medidas profilácticas. En este sentido, Holmström *et al.* (2003) realizaron entrevistas a 76 productores de camarón en donde 53 productores (69.7%) usaban antibióticos. Aunado a esto, entre el total de productores utilizaban más de diez diferentes antibióticos, además, en la mayoría de los casos los antibióticos eran usados como medida profiláctica y en algunos casos los antibióticos se adicionaban a los cultivos diariamente. Utilizar de manera inadecuada los antibióticos puede traer consigo el desarrollo de resistencia bacteriana lo que provoca una baja eficacia del tratamiento y por consecuencia pérdidas económicas para los productores.

El empleo de altas concentraciones de antibióticos en los cultivos acuícolas dificulta la aplicación correcta del tratamiento, debido al elevado costo económico que esto representa. Durante un estudio realizado por Schar *et al.* (2020) se determinó la concentración de antibióticos utilizados en cultivos de importancia acuícola en cinco países (China, Egipto, Indonesia, India, Vietnam), las concentraciones utilizadas para cada especie en cultivo fueron las siguientes: Pez gato (157 mg kg^{-1}), trucha (103 mg kg^{-1}), tilapia (59 mg kg^{-1}), camarón (46 mg kg^{-1}), salmón (27 mg kg^{-1}). Al igual que el uso inadecuado de los antibióticos, el empleo de altas dosis de antibióticos puede propiciar la resistencia bacteriana.

Dado que el uso de los antibióticos trae consigo diversos aspectos negativos como una mayor inversión económica y en ocasiones bajas eficacias del tratamiento, es necesario implementar nuevas alternativas que permitan disminuir o eliminar el uso de los antibióticos y que además sean amigables con el medio ambiente.

Una de estas alternativas es la adición de microalgas a los cultivos, un enfoque conocido como agua verde (Tamaru *et al.* 1994; Araujo *et al.*, 2020). Las microalgas han sido ampliamente estudiadas

como productoras de metabolitos, los cuales se ha demostrado pueden tener diversas actividades, entre ellas actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas de importancia acuícola (Amaro, 2011). Si bien, no están totalmente elucidados los mecanismos que las microalgas tienen para favorecer el desarrollo de los organismos en cultivo algunas de teorías incluyen: 1) Excreción de sustancias o metabolitos que controlan la proliferación de microorganismos patógenos y que estimulan el crecimiento de los organismos en cultivo; 2) si se trata de larvicultura las microalgas pueden tener un efecto sombra (atenuación de la luz) lo que tiene un efecto benéfico sobre las larvas; 3) un efecto prebiótico de las microalgas. Probablemente la efectividad del enfoque de agua verde se deba a una combinación de las teorías antes mencionadas (Tamaru *et al.*, 1994).

1.1 Antecedentes

Los principales microorganismos asociados a enfermedades en acuicultura son los virus y las bacterias (Cordero *et al.*, 2013; FAO, 2017). El primer grupo es importante debido a que ocasionan enfermedades en especies de importancia acuícola, suelen encontrarse de manera abundante en ambientes acuáticos y no se cuenta con métodos para su control (Sandaa y Bratbak, 2018). Dentro de este grupo se encuentra el nodavirus, el cual puede ocasionar altas tasas de mortalidad en larvas y juveniles de distintas especies de peces marinos, este virus ocasiona degeneración neuronal en el sistema nervioso central y daños en la retina, como lo demostraron Huang *et al.* (2001) para el barramundi (*Lates calcarifer*). Otro virus con la capacidad de ocasionar altas pérdidas económicas es el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV, por sus siglas en inglés), Ahmadivand *et al.* (2017) aislaron e identificaron este virus en alevines de trucha arcoiris, la mortalidad de los alevines infectados por este virus fue del 90%, los peces infectados presentaban distensión abdominal, exoftalmia y hemorragia en los ojos.

En cuanto a moluscos, Gu *et al.* (2019) evaluaron la prevalencia del herpesvirus del abulón en dos diferentes especies de este molusco (*Haliotis diversicolor* y *H. discus hannai*). Para ello, utilizaron una muestra de 1582 organismos, en donde alrededor del 25% de las muestras mostraron altas cargas virales, estos resultados permitieron identificar al herpesvirus como el agente etiológico de

la enfermedad viral de baja temperatura del abulón, la cual puede ocasionar problemas de mortalidad.

Por otra parte, el virus de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés), es un virus altamente patógeno con la capacidad de ocasionar pérdidas de cultivo totales, como lo describe Jatuyosporn *et al.* (2019) para el camarón tigre (*Penaeus monodon*). Otro de los virus de importancia en el cultivo de camarón es el virus de la cabeza amarilla (YHV), el cual fue descrito por primera vez en 1993 en Tailandia, donde ocasionó pérdidas masivas en cultivos de *P. monodon*. Como lo demostraron Chantanachookin *et al.* (1993) a partir de pruebas histológicas la presencia de partículas virales en muestras de camarones de la especie *P. monodon* que presentaban una coloración amarilla en el cefalotórax. De esta manera se estableció que el virus YHV es un importante patógeno para los cultivos de camarón. Por otra parte, el virus del síndrome de Taura (TSV) ha sido asociado con la aparición de enfermedades en el camarón del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*). Zarain-Hersberg y Ascencio-Valle (2000) realizaron un estudio en 33 granjas de cultivo de camarón en el estado de Sinaloa. Muestras de tejidos de camarón que presentaban necrosis y melanización en distintos órganos fueron analizadas mediante histología, los resultados mostraron un 81% de prevalencia en las muestras analizadas.

Dentro del grupo de las bacterias destacan las intracelulares tipo hepatopáncreatitis necrotizante (NHP), el género *Pseudomonas* y las bacterias del tipo *Vibrio* (Park *et al.*, 2000; Ibarra-Gómez *et al.*, 2005; Venkateswara, 2015). Este último grupo representa una de las enfermedades bacterianas con mayor prevalencia que pueden afectar peces, crustáceos y moluscos (Ina-Salwany *et al.*, 2018).

Las bacterias tipo *Vibrio* son Gram negativo, presentan formas de bacilos rectos o curvos, no forman esporas, son anaerobias facultativas, poseen un único flagelo polar que les permite tener motilidad y pertenecen a la familia *Vibrionaceae* (Thompson *et al.*, 2004). Estas bacterias son habitantes naturales de la flora y la fauna, y llegan a constituir hasta el 60% de la población bacteriana del medio ambiente en algunas regiones estuarinas (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2013). En especies como el camarón, las bacterias de este género se encuentran presentes en bajas concentraciones de manera natural en el estómago, branquias y cutícula de estos crustáceos (Santiago *et al.*, 2009). Sin embargo, cuando el sistema inmune del camarón se encuentra suprimido, estas bacterias colonizan

en altas concentraciones el estómago de los camarones lo que puede causar enfermedad y eventualmente mortalidad (Defoirdt *et al.*, 2011).

Diferentes especies de bacterias pertenecientes al género *Vibrio* tienen la capacidad de ocasionar enfermedades en diversas especies de importancia acuícola. En este contexto, Anguiano-Beltrán *et al.* (1998), evaluaron la patogenicidad de *V. alginolyticus* (ATCC 17749) en larvas y postlarvas de abulón rojo (*H. rufescens*), los resultados indican que una concentración de 1×10^5 células bacterianas pueden causar mortalidades masivas en las larvas de abulón en las primeras 24 h. Por otra parte, en 2004, el mismo grupo de trabajo realizó ensayos para evaluar la supervivencia y normalidad (cambios morfológicos) en larvas veliger del mejillón del mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) al ser expuestas a distintas concentraciones de *V. alginolyticus* (ATCC 17749) (1×10^2 a 1×10^6 cél mL⁻¹). Los resultados mostraron una supervivencia del 79%; sin embargo, el 89% de las larvas presentaron una forma irregular y una reducción en los filamentos del biso cuando las concentraciones bacterianas eran superiores a 1×10^4 cél mL⁻¹, por lo que los autores sugieren mantener concentraciones menores de 1×10^3 cél mL⁻¹ durante el cultivo de larvas de *M. galloprovincialis*.

Por otra parte, Cai *et al.* (2006) aislaron 15 cepas bacterianas a partir de juveniles de cobia (*Rachycentron canadum*) que presentaban signos de letargia, piel oscura y ojos dañados. Los 15 aislamientos bacterianos fueron identificados como *Vibrio alginolyticus* al ser comparados con la cepa de referencia *V. alginolyticus* (ATCC 17749), estos resultados revelan que esta especie bacteriana es un patógeno de importancia en el cultivo de cobia. En otro estudio, Long-Uong y Jiann-Chu (2005) demostraron que *L. vannamei* es susceptible a *V. alginolyticus* cuando el sistema inmune del camarón se encuentra suprimido.

Mediante un estudio realizado por Wang *et al.* (2015) a partir de muestras de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) que presentaban fluorescencia, disminución en el consumo de alimento y altas tasas de mortalidad, se lograron aislar bacterias, las cuales a partir de métodos moleculares fueron identificadas como *V. campbellii*. Además, el gen *hly* que codifica para el factor de virulencia hemolisina fue identificado y comparado con el gen homólogo de la cepa de referencia *V. campbellii* CAIM 416 (Collection of Aquacultural Importance Micro-Organism), en donde se encontró una similitud del 99%. Estos factores de virulencia son muy potentes y presentan actividades hemolíticas

y citolíticas, por lo que tienen la capacidad de destruir el epitelio intestinal de los camarones y eventualmente ocasionar mortalidad (Ruwandepika *et al.*, 2010).

En 2018, Praja y Safnurbaiti, demostraron que las especies de camarón *L. vannamei*, *Penaeus monodon* y *P. chinensis* son susceptibles a infecciones ocasionadas por *V. parahaemolyticus*, esta cepa ocasiona la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHNPD, por sus siglas en inglés), dicha enfermedad puede llegar a ocasionar pérdidas totales en los cultivos (Flegel, 2012; Li *et al.*, 2017).

Por otro lado, Zhang y Austin (2000) obtuvieron 19 aislamientos bacterianos identificados como *V. harveyi*, de los cuales 14 fueron patógenos para la trucha arcoíris (*O. mykiss*) y el salmón del Atlántico (*S. salar*). Además, se realizaron ensayos en los que se inoculó vía intraperitoneal una concentración de 1×10^6 cél organismo⁻¹ en donde se observaron mortalidades de hasta el 100%. Además, Aguirre-Guzmán *et al.* (2004) y Chatterjee y Haldar (2012) evidenciaron que *V. harveyi* puede ocasionar daños en cultivos de camarón blanco del pacífico (*L. vannamei*).

Por lo anterior, es fundamental contar con los métodos de control adecuados que detengan el crecimiento o eliminen este tipo de bacterias patógenas de los sistemas de cultivo. Actualmente, el principal método de control de bacterias del género *Vibrio* es el tratamiento con antibióticos.

De acuerdo con su mecanismo de acción, los antibióticos pueden dividirse en dos grupos: bacteriostáticos y bactericidas. Los primeros son aquellos que impiden la multiplicación y desarrollo de los patógenos, y el segundo grupo, hace referencia a aquellos antibióticos que ocasionan la muerte de los patógenos (Girón-Matute, 2008). Los antibióticos son empleados mayormente en el área de la ganadería, por lo que aproximadamente el 50% de la producción mundial de estas sustancias son utilizadas en esta actividad. Los antibióticos son utilizados en animales sanos como profilácticos y promotores del crecimiento, por lo que estos usos superan ampliamente la aplicación de los antibióticos como terapéuticos (Torres y Zarazaga, 2002). En acuicultura, estos fármacos se utilizan para prevenir y tratar infecciones bacterianas en diversos cultivos, principalmente de peces e invertebrados (Bermúdez-Almada *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2018). Sin embargo, al igual que en otras áreas de producción, los antibióticos se utilizan erróneamente como medidas profilácticas, lo que puede ocasionar que las bacterias desarrollen mecanismos de resistencia ante los antibióticos

y de esta manera la eficacia de la terapia se vea sumamente reducida (Santiago *et al.*, 2009; Chávez-Domínguez, 2018).

Uno de los factores más importantes a considerar al momento de seleccionar un antibiótico es su costo económico, ya que existen diversos tratamientos basados en antibióticos que han demostrado ser muy efectivos. Sin embargo, los costos económicos para aplicar estos antibióticos en las concentraciones y tiempos adecuados resultan muy onerosos, y en diversas ocasiones es muy complicado aplicar el tratamiento completo en los cultivos infectados por *Vibrio* spp. Al no aplicar los antibióticos de la manera correcta, las bacterias pueden llegar a desarrollar mecanismos de resistencia al antibiótico (Santiago *et al.*, 2009; Bermúdez-Almada *et al.*, 2014). Otro problema asociado al uso de antibióticos es la contaminación de aguas subterráneas, debido a que estos son administrados principalmente en el alimento, por lo que una parte del antibiótico se queda en el agua, además, otra parte no es absorbida por el organismo acuático y es liberada en las heces, la orina y otros fluidos, contaminando las aguas subterráneas (Capone *et al.*, 1996).

En el año 2017, el uso total de antibióticos en acuicultura a nivel mundial fue aproximadamente de 10,259 toneladas y se estima que para el 2030 esta cifra aumente alrededor del 30% (Schar *et al.*, 2020). Del total de antibióticos que se emplean para acuicultura en todo el mundo la región Asia-Pacífico representa un 94%, seguidos por África y Europa con un 2%, respectivamente (Schar *et al.*, 2020).

En México, los antibióticos utilizados con mayor frecuencia para combatir las enfermedades producidas por bacterias del género *Vibrio* son: Oxitetraciclina, Florfenicol, Ormetoprima, Sulfametoxazol, Sarafloxacina, Enrofloxacino y Ciprofloxacino (Roque *et al.*, 2001). En la tabla 1, se muestran las dosis y los días de duración de la terapia de antibióticos mayormente usados en acuicultura.

Tabla 1. Dosis y duración de terapia de los principales antibióticos usados en acuicultura.

Antibiótico	Dosis (mg kg ⁻¹ de biomasa)	Duración de la terapia (días)
Oxitetraciclina	120-240	7-12
Ciprofloxacino	10-15	7-12
Enrofloxacino	10-15	7-12
Florfenicol	50-80	7-12

Tomada y modificada de Santiago *et al.* (2009).

Como se observa en la tabla 1, los antibióticos oxitetraciclina y florfenicol requieren dosis altas y la duración de las terapias es prolongada, estos dos aspectos pueden favorecer el desarrollo de resistencia por parte de las bacterias. En México, como en la mayoría de los países, no se cuenta con una regulación sobre el uso de antibióticos, es decir, no está establecido que antibióticos y a que dosis deben usarse ni durante cuantos días. México cuenta con la norma NOM-EM-05-PESC-2002, la cual establece los requisitos y medidas para prevenir o controlar la dispersión de enfermedades de alto impacto, así como para el uso y aplicación de antibióticos en la camaronicultura nacional. Sin embargo, en esta norma no se establece ningún tipo de regulación sobre el uso de los antibióticos. Todos los problemas mencionados anteriormente entorno al uso de antibióticos, conllevan a la búsqueda de nuevas alternativas que disminuyan o reemplacen por completo el uso de estos fármacos en la acuicultura.

Entre las alternativas contra uso de antibióticos para el control de bacterias patógenas en acuicultura destacan las siguientes: control con bacteriófagos, inhibición de la replicación del cromosoma II de *Vibrio* spp., inhibición de la expresión de genes de virulencia e inhibición del crecimiento por metabolitos secretados por microalgas (Defoirdt *et al.*, 2011).

Los bacteriófagos son virus que infectan exclusivamente a bacterias, esta cualidad ha sido ampliamente utilizada desde su descubrimiento, realizando terapias con bacteriófagos contra bacterias patógenas. Esta estrategia fue muy utilizada, sin embargo, con el descubrimiento de los antibióticos en los años 40, el uso de los bacteriófagos disminuyó considerablemente. Actualmente, debido a los problemas asociados con los antibióticos, se ha vuelto a retomar el uso de bacteriófagos (Segundo *et al.*, 2010). En acuicultura los bacteriófagos han sido empleados para controlar bacterias patógenas como las del género *Aeromonas* (Nakai y Park, 2002).

Una alternativa dirigida exclusivamente a la erradicación de bacterias del género *Vibrio* es la inhibición de la replicación del cromosoma II de estas bacterias, para ello, se aprovecha que el genoma de estas bacterias se encuentra compartido en dos cromosomas. La replicación del cromosoma II, es iniciada por el gen *rctB* el cual se encuentra presente en todas las bacterias de este género, lo que lo convierte en un blanco ideal para inhibir el crecimiento de estos patógenos (Egan y Waldor, 2003). En este contexto, Yamaichi *et al.* (2009) evaluaron la actividad de un compuesto

llamado vibrepin, el cual demostró ser eficaz evitando la expresión del gen *rctB* en diversas especies del género *Vibrio*.

Otra opción se basa en la inhibición de la expresión de genes de virulencia de las bacterias patógenas. En este enfoque, primero deben de identificarse los genes de virulencia en las bacterias patógenas de interés, y posteriormente, buscar mecanismos que permitan inhibir la expresión de dichos genes (Defoirdt *et al.*, 2011). Con base en lo anterior, Jyn-Hyung *et al.* (2014) evaluaron tratamientos a distintas concentraciones de nanopartículas de ZnO (0.5 y 1 Mm) en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* para evaluar la producción de cuatro factores de virulencia piocianina, señal de quinolona en *Pseudomonas* (PQS, por sus siglas en inglés), pioquelina y pioverdina. Los resultados demostraron que los tratamientos con nanopartículas de ZnO 1 mM, disminuyeron la producción de los factores de virulencia, con excepción de la pioverdina, la cual aumentó su producción con los distintos tratamientos de nanopartículas.

Otra de las alternativas prometedoras consiste en la inhibición del crecimiento de patógenos a partir de compuestos producidos por microalgas, como los ácidos grasos (Figura 1). Diversos estudios han demostrado que estos compuestos presentan actividad antimicrobiana contra un amplio espectro de bacterias patógenas. En este sentido, el uso de microalgas con aplicaciones antimicrobianas es una estrategia que puede disminuir el uso de antibióticos, debido a que se ha demostrado que estos microorganismos tienen una gran capacidad de producir diversos compuestos con actividad antimicrobiana entre los que se encuentran los polisacáridos y los ácidos grasos (Deifordt *et al.*, 2011). Las diatomeas, son un grupo de algas unicelulares que han sido utilizadas como productoras de metabolitos con actividad biológica (Naviner *et al.*, 1999). Las diatomeas se encuentran en todos los océanos y representan uno de los tipos más comunes de fitoplancton (Sadava *et al.*, 2008). Por lo tanto, estos microorganismos son prometedores en el área de la biotecnología como productores de compuestos con distintas actividades, como la actividad antibacteriana, que permita inhibir el crecimiento de bacterias patógenas (Amaro *et al.*, 2011). Entre las principales características de interés de las diatomeas, se encuentran un notable metabolismo, requieren solo fuentes inorgánicas de bajo costo como nitrógeno y fósforo, usan dióxido de carbono como nutriente esencial y dependen de la luz para cumplir con los requerimientos energéticos.

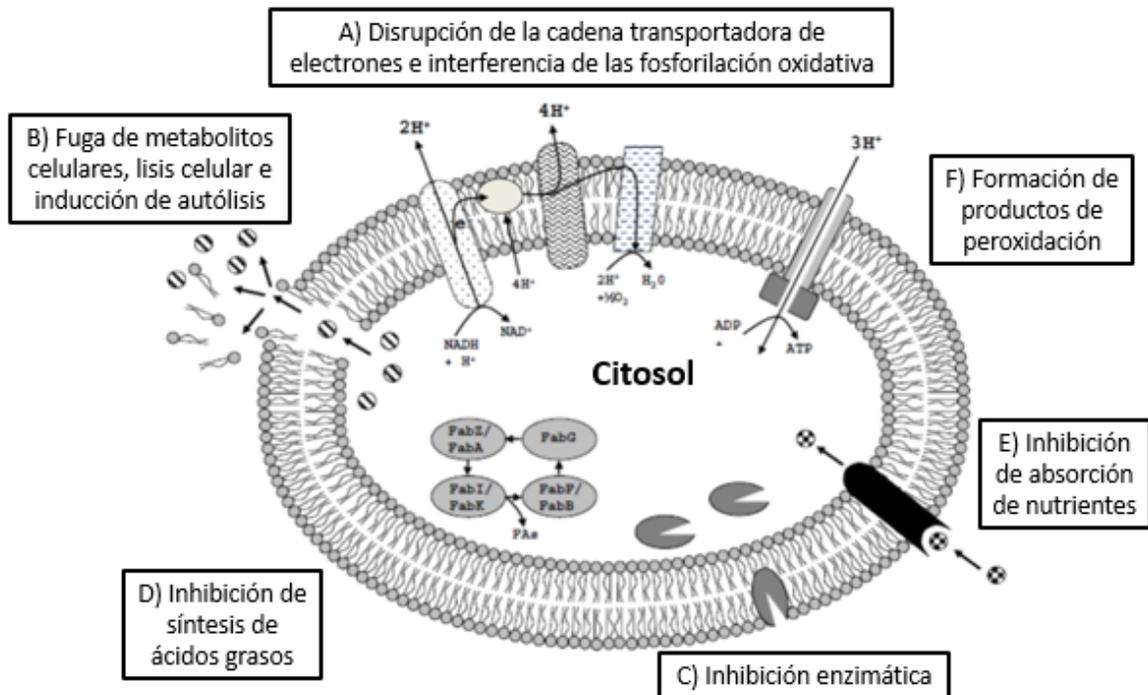


Figura 1. Posibles mecanismos celulares de la acción antibacteriana de los ácidos grasos libres. A) La disrupción de la cadena transportadora de electrones y la interferencia de la fosforilación oxidativa en las bacterias debido a los ácidos grasos pueden afectar la producción de energía. B) Los ácidos grasos podrían provocar la fuga de metabolitos de la célula bacteriana, lisis celular y autólisis. A su vez, podrían causar la inhibición de las enzimas de membrana y citosólicas (C), incluidas las necesarias para síntesis de ácidos grasos (D). E) También pueden afectar la absorción activa de nutrientes actuando directamente sobre la proteína de transporte o como resultado indirecto de la incapacidad de la célula bacteriana para producir ATP. F) Los productos de peroxidación de los ácidos grasos pueden presentar efectos nocivos sobre la célula bacteriana y desempeñar un papel en la destrucción celular. Tomada y modificada de Desbois y Smith (2010).

Se ha demostrado que las microalgas tienen una gran capacidad para producir diversos metabolitos con aplicaciones muy prometedoras. Algunos de estos compuestos presentan alta actividad contra bacterias patógenas de importancia en acuicultura, por lo que dichos compuestos pueden ser utilizados como alternativa al uso de los antibióticos (Amaro *et al.*, 2011).

Existen dos metodologías que permiten determinar la actividad antibacteriana de las microalgas: la primera consiste en evaluar los extractos celulares obtenidos de las microalgas y la segunda metodología se lleva a cabo de manera *in vivo*, mediante un enfoque denominado agua verde. El uso de los extractos celulares es más específico, ya que, al evaluar los distintos extractos obtenidos a partir de las microalgas, se puede conocer el componente activo que presenta la actividad

antibacteriana y a partir de ese componente elaborar un tratamiento contra el patógeno de interés. Sin embargo, esta metodología puede presentar desventajas, por ejemplo, el componente activo de interés puede ser producido en bajas cantidades por las microalgas, lo que conlleva a que la actividad del extracto sea de baja eficacia o bien, tengan que producirse grandes cantidades de biomasa para producir el compuesto activo en concentraciones considerables.

En la técnica de evaluación *in vivo* se emplean cultivos de microalgas, los cuales son inoculados con las bacterias patógenas para evaluar la actividad antibacteriana de los cultivos de interés. Las microalgas son utilizadas ampliamente en acuicultura para alimentación de diversos cultivos, tales como larvas de moluscos, equinodermos, peces y crustáceos (Müller-Feuga, 2000). Además de proporcionar nutrientes, las microalgas pueden funcionar como sistemas de biocontrol y mejorar la calidad de agua, ya que tienen la capacidad de remover el fósforo y el nitrógeno (Garzón-Zúñiga *et al.*, 2012). Una de las desventajas de esta metodología, es que no se conoce el componente activo que presenta la actividad antibacteriana ni su mecanismo de acción.

Entre los principales componentes con actividad antibacteriana producidos por las microalgas se encuentran los polisacáridos y los ácidos grasos. A continuación, se presentan los principales estudios donde se ha encontrado que los componentes activos que tienen la actividad antimicrobiana son los polisacáridos y los ácidos grasos. Desbois *et al.* (2008), realizaron un estudio con la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* utilizando extractos acuosos, y demostraron que el ácido eicosapentanoico (EPA), un ácido graso poliinsaturado, presenta una alta actividad contra las bacterias patógenas *Vibrio anguillarum*, *Micrococcus luteus* y *Photobacterium* sp.

En el 2010, Sánchez-Saavedra *et al.* evaluaron la actividad antibacteriana de extractos orgánicos de seis especies diferentes de fitoplancton (*Synechococcus elongatus*, *Synechocystis* sp., *Dunaliella tertiolecta*, *Chaetoceros muelleri*, *Porphyridium cruentum* y *Amphiprora paludosa*) contra diferentes bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas. Los extractos orgánicos de las seis especies de fitoplancton evaluadas presentaron actividad contra la bacteria *Bacillus subtilis*. Además, con excepción de *P. cruentum*, todas las especies de fitoplancton mostraron actividad contra *Staphylococcus aureus*. Por lo tanto, los extractos de fitoplancton podrían ser utilizados para el control de *B. subtilis* y *Staphylococcus aureus*. Por otro lado, Bhagavathy *et al.* (2011), estudiaron la actividad antibacteriana de diversos compuestos bioactivos de la microalga *Chlorococcum humicola*.

Los compuestos evaluados fueron extraídos con diversos solventes orgánicos tales como acetona, benceno, cloroformo, entre otros. Los compuestos bioactivos que presentaron actividad antibacteriana contra *V. cholerae*, *Klebsiella pneumoniae* y *B. subtilis* fueron carotenoides, alcaloides, carbohidratos y ácidos grasos.

En el 2012, González-Davis *et al.* evaluaron extractos acuosos y orgánicos de veintiocho especies de microalgas marinas y cianobacterias contra *V. campbellii*, nueve de estos extractos presentaron actividad antibacteriana contra *V. campbellii*. Además, utilizaron las microalgas *Dunaliella tertiolecta* y *Skeletonema costatum* en cultivos de agua verde para juveniles de *L. vannamei* para evaluar su efecto contra bacterias patógenas del género *Vibrio*, sin embargo, no se encontraron diferencias en la mortalidad entre los tratamientos probados. Por otro lado, los camarones que fueron suplementados con la microalga *S. costatum*, presentaron altos valores de masa orgánica y una mayor tasa de crecimiento, lo que indica que las microalgas además de producir compuestos antibacterianos ayudan en la nutrición de *L. vannamei*.

Por su parte, Najdenski *et al.* (2013) evaluaron de manera *in vitro* la actividad antimicrobiana de nueve cepas de cianobacterias y diez cepas de microalgas contra ocho patógenos que pueden ocasionar enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's). Extractos acuosos obtenidos de las cianobacterias *Gloeocapsa* sp. y *Synechocystis* sp. presentaron el espectro de actividad más amplio. En tanto que, *Anabaena* sp. presentó la actividad antimicrobiana más alta, pero solo contra bacterias Gram positivas. Por otra parte, los ácidos grasos de todas las microalgas evaluadas presentaron actividad contra las bacterias *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*. Por último, los exopolisacáridos (EPS) provenientes de *Gloeocapsa* sp. presentaron actividad contra los ocho patógenos utilizados en este estudio, lo que convierte a los EPS de *Gloeocapsa* sp. en una potencial alternativa contra el uso de los antibióticos.

Molina-Cárdenas *et al.* (2014) evaluaron la actividad antibacteriana de *Isochrysis galbana* contra tres especies de bacterias patógenas del género *Vibrio*: *V. alginolyticus*, *V. campbellii* y *V. harveyi*. Se realizó un reto y se inoculó 1×10^2 UFC mL⁻¹ de cada una de las tres especies de *Vibrio*. Por acción de *I. galbana* las concentraciones de *Vibrio* en los cultivos llegaron a niveles indetectables después de 24 a 144 h en dependencia de la especie de *Vibrio*. Durante la fase estacionaria se evaluó la composición de ácidos grasos, siendo los más predominantes el ácido estearidónico, ácido oleico y

el ácido mirístico, por lo que se sugiere que la actividad antibacteriana de *I. galbana* es debida a la producción de estos ácidos grasos. Molina-Cárdenas *et al.* (2020) estudiaron el efecto de *V. cholerae* en el perfil de ácidos grasos de *I. galbana*. Los resultados mostraron que la interacción entre *V. cholerae* e *I. galbana* provocó un aumento en los niveles de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés), a saber, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido eicosatrienoico y el ácido eicosatetranoico. Debido a que estos ácidos grasos antes mencionados, son de importancia desde el punto de vista nutricional y farmacéutico, esta interacción podría ser aprovechada por el área biotecnológica para producir mayores niveles de estos ácidos grasos. Sin embargo, para aprovechar el aumento de estos ácidos grasos por parte de las microalgas debido a la interacción con bacterias patógenas, como las del género *Vibrio*, es necesario eliminar la patogenicidad en las bacterias para que la aplicación farmacéutica o nutricional de los ácidos grasos de las microalgas sea seguro.

Alsenani *et al.* (2020) evaluaron la actividad antimicrobiana de tres microalgas (*I. galbana*, *Scenedesmus* sp. NT8c, *Chlorella* sp. FN1) contra nueve bacterias patógenas de importancia vegetal y alimentaria. Los ensayos de inhibición se realizaron mediante ensayos de difusión en disco donde se demostró que las tres especies de microalgas presentaron actividad antibacteriana contra seis de las nueve bacterias patógenas evaluadas. Finalmente, mediante técnicas de cromatografía se lograron identificar cuatro ácidos grasos (linolénico, oleico, docosahexaenoico, eicosapentanoico) como los principales candidatos con efecto inhibitorio.

1.2 Justificación

Distintas especies de bacterias del género *Vibrio* tienen la capacidad de causar enfermedades en cultivos de importancia acuícola. Algunas de estas especies pueden llegar a ocasionar pérdidas totales en los cultivos acuícolas, lo que se traduce en pérdidas económicas importantes para los productores. Por ello, es fundamental contar con los métodos que permitan controlar a estas bacterias que tienen impacto en la acuicultura. Actualmente, el método más utilizado es el uso de antibióticos, sin embargo, las bacterias pueden desarrollar mecanismos de resistencia, lo que provoca una baja eficacia del antibiótico para controlar enfermedades en la acuicultura. Además, los antibióticos son contaminantes de las aguas residuales de la industria acuícola. Por lo anterior,

implementar nuevas alternativas como el uso de microalgas para la inhibición de bacterias que causen problemas de enfermedades en la industria acuícola como las del género *Vibrio*, será de gran ayuda para prevenir o disminuir las enfermedades ocasionadas por estas bacterias. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto inhibitorio de las diatomeas *N. thermalis* y *N. subinflatooides* contra tres especies patógenas del género *Vibrio* (*V. campbellii*, *V. alginolyticus* y *Vibrio harveyi*). Las diatomeas utilizadas en este trabajo fueron aisladas en Baja California, México, por lo que al estar adaptadas a las condiciones ambientales de esta zona podrían ser buenas alternativas para su uso en cultivos de esta región.

1.3 Hipótesis

- La densidad de *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii* disminuye en relación inversa a la densidad celular de los cultivos monoespecíficos de las diatomeas *Navicula* cf. *subinflatooides* o *Nitzschia thermalis* f. *kurta*.
- El contenido de carbohidratos disminuye en cada una de las especies de diatomeas (*Navicula* cf. *subinflatooides* o *Nitzschia thermalis* f. *kurta*), al ser mantenidas en cocultivos con cada especie de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto inhibitorio de las diatomeas *Nitzschia thermalis* y *Navicula subinflatooides* contra *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*

1.4.2. Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad inhibitoria de las diatomeas (*N. thermalis* y *N. subinflatoides*) contra *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*), mediante monitoreo de la densidad de células de las diatomeas, del contenido de *Vibrios* y de la cantidad de bacterias heterotróficas.
- Caracterizar la composición proximal, respuesta fotosintética y perfil de ácidos grasos de cada una de las especies de diatomeas (*N. thermalis* y *N. subinflatoides*), al ser mantenidas en cocultivos con cada especie de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*).

Capítulo 2. Metodología

2.1 Origen de las cepas de diatomeas

Las cepas de las diatomeas utilizadas en este estudio fueron aisladas por Jiménez-Valera y Sánchez-Saavedra (2016) a partir de muestras de agua de mar provenientes de Baja California, la diatomea *Nitzschia thermalis* f. *kurta* (Figura 42) fue aislada de San Quintín, mientras que *Navicula* cf. *subinflatooides* (Figura 42) fue aislada en Ensenada.

Las dos cepas de diatomeas antes mencionadas se obtuvieron de la colección del Laboratorio de Biotecnología de Algas (BIOAL), del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE).

2.2 Mantenimiento de cepas y cultivos de diatomeas

Las cepas de las dos especies de diatomeas bentónicas se mantuvieron de forma no axénica y monoespecífica en “batch” o sistemas por lotes en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 100 mL de agua de mar estéril con medio “f” (Guillard y Ryther, 1962) y sin recambio de medio. Los medios de cultivo se prepararon utilizando agua de mar proveniente del sistema semicerrado y que abastece el Laboratorio Húmedo Central del Departamento de Acuicultura (CICESE). El agua de mar tuvo un proceso de sedimentación y fue pasada por una serie de filtros rápidos de arena y cartuchos de fibra de vidrio de 10, 5 y 1 μm y fue irradiada con luz ultravioleta. Además, el agua de mar fue esterilizada en una autoclave a 121 °C y a una presión de 1.02 kg cm^{-2} durante 20 min.

Para cada uno de los cultivos se realizó un mantenimiento semanal al inocular un nuevo cultivo con un 10% de cultivo madre. Las condiciones ambientales a las que fueron mantenidos los cultivos son: temperatura de 22 °C \pm 1 °C, irradiancia continua de luz blanca fría (SILVANIA F40W) a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, salinidad de 35 \pm 0.03 g L^{-1} , sin aireación y agitación manual diaria.

2.3 Caracterización de la curva de crecimiento de las diatomeas

El crecimiento de los cultivos de las diatomeas *N. subinflatooides* y *N. thermalis* se realizó de forma monoespecífica, por triplicado y en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 100 mL de medio "F" preparado con agua de mar. Los cultivos se mantuvieron en similares condiciones ambientales como las descritas en el inciso 2.2.

Para evaluar el crecimiento de los cultivos de las diatomeas, se realizaron conteos celulares diarios con un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad y un microscopio compuesto (Olympus CX-31). La tasa de crecimiento se evaluó con la ecuación 1, descrita por Fogg y Thake (1987) y el tiempo de generación con la ecuación 2.

$$\mu = \frac{(\log_2 N_2) - (\log_2 N_1)}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

μ = Tasa de crecimiento específica (divisiones por día)

N_2 = Concentración de células tiempo 2

N_1 = Concentración de células tiempo 1

\log_2 = Logaritmo de base dos de la concentración de células

t_2 = Tiempo 2

t_1 = Tiempo 1

$$TG = 1/\mu \quad (2)$$

TG= Tiempo de generación

μ = tasa de crecimiento

Además de los conteos celulares, el crecimiento de las diatomeas se evaluó mediante turbidimetría, para ello, se colocaron 1.5 mL de cultivo en una celda y se midió la absorbancia a una longitud de

onda de 680 nm. Durante la caracterización del crecimiento de las diatomeas, diariamente fueron monitoreados los parámetros de temperatura y pH (potenciómetro Ohaus Starter 3100).

2.4 Cultivo de *Vibrio*

Las tres cepas de *Vibrio* seleccionadas por ser patógenas para organismos acuáticos en cultivo fueron: *Vibrio alginolyticus* proveniente de la “American Type Culture Collection” (ATCC) 17749 (CICESE 04), *V. harveyi* DN 01 (CICESE 597), donada por la Dra. Martha Gómez-Chiarri de la Universidad de Rhode Island USA, señalado como patógeno para el lenguado del Atlántico, *Paralichthys dentatus* y *V. campbellii* (CICESE 559) (cepa Z-2), aislada por la Dra. Ivon Gifard en una granja camaronícola de Sonora en 1999 y depositada en la “Collection of Aquacultural Importance Micro-Organism” (CAIM 416), del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). Las tres especies de *Vibrio* fueron obtenidas de la colección de microorganismos del CICESE, las cuales se encuentran resguardadas por el Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida, investigador del Departamento de Biotecnología Marina del CICESE.

Los cultivos de las tres especies de *Vibrio* se realizaron en tubos de vidrio con 10 mL de medio ZoBell (DIFCO) (Oppenheimer y Zobell, 1952). El medio de cultivo ZoBell se esterilizó previamente en una autoclave a 121 °C y a una presión de 1.02 kg cm⁻¹ durante 20 min. Para cada especie de *Vibrio* se tomó una asada del tubo, la cual fue sembrada de forma monoespecífica en cajas Petri con 20 mL de medio ZoBell. Las cajas con los cultivos de las distintas especies de *Vibrio* spp. fueron incubadas a 28 °C por 24 h.

2.5 Preparación de inóculo de bacterias

Se emplearon tubos de cultivo de 20 mL con tapa de rosca, los cuales se llenaron con 9 ml de suero fisiológico (cloruro de sodio) y se esterilizaron a las mismas condiciones mencionadas en la sección 2.4. Una vez esterilizados se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

Los cultivos de las tres especies de *Vibrio* se sembraron densamente y de manera individual en cajas Petri con medio ZoBell y, posterior al tiempo de incubación, a cada uno de los cultivos se le agregó de 2 a 3 mL de suero fisiológico. Después de agregar el suero se removió la capa de bacterias con ayuda de una pipeta, evitando raspar la superficie del medio. La mezcla de suero fisiológico y las bacterias que fueron recuperadas de las cajas Petri se regresaron al tubo del cual se tomaron los mL de suero inicialmente. Los tubos con el inóculo madre de cada una de las especies de bacterias se agitaron y se dejaron reposar hasta que los agregados de bacteria se encontraran completamente disueltos. Una vez que ya no se observaban agregados bacterianos, se adicionó por goteo de esta mezcla a un nuevo tubo de cultivo con suero fisiológico y se realizaron mediciones en un espectrofotómetro a 600 nm, hasta obtener una densidad óptica de 0.05 lo que corresponde a una densidad de 1×10^6 UFC mL⁻¹ (Anguiano-Beltrán, 1996).

2.6 Conteo de bacterias

Antes de inocular los cultivos de diatomeas con *Vibrio* spp. se cuantificó el número de bacterias heterotróficas mediante conteo indirecto en medio ZoBell y además se corroboró la ausencia de bacterias del género *Vibrio* en los cultivos de las diatomeas *N. subinflatooides* y *N. thermalis*.

Para la evaluación de la posible presencia de *Vibrio* en los cultivos de diatomeas, se realizó el siguiente procedimiento: Se prepararon cajas Petri que contenían medio Tiosulfato Citrato Bilis Sucrosa (TCBS, DIFCO) (Tamura *et al.*, 1971) en las cuáles se colocaron los filtros con las muestras de los cultivos de diatomeas. Se filtraron volúmenes de 1 y 10 mL de cultivo de las diatomeas *N. subinflatooides* y *N. thermalis* mantenidas en cultivos de manera individual. La colecta de muestras se realizó mediante filtros estériles de nitrocelulosa de 47 mm de diámetro, con cuadrícula de referencia y una luz de malla de 0.22 μ m. Las cajas Petri con los filtros se incubaron a 28 °C durante 24 h, pasado este tiempo se revisaron las cajas para confirmar la presencia o ausencia de colonias de bacterias del género *Vibrio*.

El número de bacterias heterotróficas que se encontraban en los cultivos de las diatomeas *N. subinflatooides* y *N. thermalis* se cuantificó mediante dilución en serie. Para lo anterior, se tomó 1 mL

de cada cultivo y para cada caso se realizaron diluciones hasta 10^{-3} , posteriormente, se tomaron 100 μL de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} y se sembraron en cajas Petri con medio ZoBell, preparado como ya descrito en la sección 2.4. Las cajas Petri con las muestras se incubaron a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un período de 24 a 48 h. Después del tiempo de incubación, las colonias se contaron con ayuda de un contador de colonias marca Reichert. El número de colonias contadas se expresó en UFC presentes en 1 ml (UFC mL^{-1}). Este procedimiento se repitió después de inocular los cultivos de diatomeas con cada una de las tres especies de *Vibrio* a las 0, 24, 48, 96 y 168 h.

2.7 Retos de inhibición del crecimiento de *Vibrio*

Los cultivos de las diatomeas *N. subinflatooides* y *N. thermalis* descritos en la sección 2.3 se utilizaron como inóculo y se corroboró para cada caso, la ausencia de las bacterias del género *Vibrio* siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.4.

Para cada especie de diatomea se tenían cultivos monoespecíficos, no axénicos y por triplicado en matraces Erlenmeyer de 1.0 L que contenían 800 mL de medio “f”. La concentración inicial de células de cada especie de diatomea fue de 100,000 células mL^{-1} . En cada uno de los cultivos se cuantificó el número de bacterias heterotróficas como se indicó en la sección 2.6.

Para el reto de inhibición del crecimiento de *Vibrio*, los cultivos de diatomeas se inocularon con un volumen apropiado de bacterias, hasta que se obtuvo una concentración de 1×10^2 UFC mL^{-1} para cada una de las tres especies de *Vibrio* (*Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi* y *V. campbellii*) (día 0+1). El inóculo de cada especie de *Vibrio* se preparó como se mencionó en la sección 2.5. Como tratamientos control, se utilizaron cultivos por triplicado y sin inóculo de bacterias tipo *Vibrio* para cada especie de diatomea y cultivos de cada especie de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*) en medio “f” sin células de diatomeas.

En los cultivos mantenidos para los distintos tratamientos en el reto de inhibición y en los tratamientos control, cada día se evaluaron las densidades celulares de las diatomeas como se

describió en la sección 2.3, por su parte, las densidades celulares de las bacterias heterotróficas (sección 2.6) y la densidad de *Vibrio* (ver sección 2.5) se evaluaron a las 0, 24, 48, 96 y 168 h.

Los tratamientos experimentales usados en el reto y los tratamientos control se mantuvieron a $22 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a una irradiancia continua de $100 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en el Laboratorio de Cultivo de Microorganismos del Departamento de Biotecnología Marina del CICESE.

Durante la fase exponencial y estacionaria del crecimiento de los cultivos de cada especie de diatomea, así como para cada condición experimental, se colectó un volumen apropiado para realizar el análisis de peso seco, composición proximal, perfil de ácidos grasos, respuesta fotosintética y pigmentos.

2.8 Medición de células

Las diatomeas *N. subinflatooides* y *N. thermalis* se midieron al inicio de los retos de inhibición (día 0) y al final de estos (día 8). Se tomó 1 mL de cada tratamiento y se fijó con lugol, las muestras fueron observadas en un microscopio de fluorescencia y se realizaron mediciones de largo y ancho de las células a través del programa Image-Pro Plus versión 5.1.

2.9 Evaluación del peso seco de las diatomeas *N. subinflatooides* y *N. thermalis*

2.9.1 Peso seco

El peso seco de los cultivos se evaluó en las fases exponencial y estacionaria, por estimación gravimétrica y de acuerdo con el método descrito por Sorokin (1973). Para obtener el peso seco total de las muestras, se tomaron 15 mL y se pasaron por filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C de 47 mm de diámetro y $1.0 \text{ } \mu\text{m}$ de abertura de poro. Las muestras se enjuagaron con formiato de

amonio al 3% para eliminar las sales presentes en el medio. Los filtros con muestra se introdujeron en una estufa a 60 °C durante el tiempo necesario, hasta que alcanzaron un peso seco constante.

Para evaluar las cenizas, los filtros con las muestras se colocaron en una mufla (Barnstead Thermolyn 1400) a 490 °C por 12 h. Pasado este tiempo, los filtros se colocaron en un desecador con sílica gel por 15 min para alcanzar la temperatura ambiente. Posteriormente, los filtros se pesaron en una balanza analítica (Mettler Toledo).

El peso seco total (PST) se obtuvo por la diferencia del peso seco del filtro con la muestra, respecto al peso del filtro solo. El peso de las cenizas se obtuvo con el peso después de incinerar la muestra menos el peso del filtro solo. El peso seco orgánico (PSO) se obtuvo por la diferencia del peso seco total respecto al peso de las cenizas.

2.10 Extracción y cuantificación de pigmentos

La extracción de pigmentos se llevó a cabo mediante la metodología descrita por Parsons *et al.* (1984), la cuantificación se realizó mediante espectrofotometría y empleando las ecuaciones descritas por Jeffrey y Humphrey (1975). Para ello se filtraron 5 mL de cultivo de cada uno de los tratamientos tanto en fase exponencial como en fase estacionaria. Para llevar a cabo la extracción los filtros fueron colocados en tubos de vidrio previamente forrados con papel aluminio, se agregaron 5 mL de acetona al 90% y los tubos fueron mezclados gentilmente con la ayuda de un vortex. Finalmente, las muestras fueron colocadas en refrigeración (4 °C) durante 24 h.

La cuantificación se llevó a cabo por lecturas mediante un espectrofotómetro (HACH DR-6000) colocando las muestras en una celda de cuarzo de 4 mL. Las lecturas se realizaron con un barrido espectral de 400 a 700 nm de longitud de onda (λ) y se empleó como blanco de medición acetona al 90%.

2.11 Medición de fotosíntesis

La medición de fotosíntesis se realizó con un fluorímetro de amplitud modulada JUNIOR-PAM marca WALZ. Para ello, se tomaron muestras de 10 mL de cada uno de los tratamientos en las fases exponencial y estacionaria, se colocaron en tubos de 15 mL previamente forrados con papel aluminio y se mantuvieron en oscuridad por 15 min. El equipo de medición a partir del software Win-Control-3 genera curvas rápidas de luz (CRL), mismas que exponen las muestras a intensidades crecientes de iluminación actínica (0, 25, 45, 66, 90, 125, 190, 285, 420, 625, 845, 1150 y 1500 nm). Adicionalmente, se realizaron mediciones de los espectros de absorción *in vivo*, para realizar el cálculo de la absorbancia. Para ello se emplearon 1.5 mL de cultivo de cada tratamiento por triplicado tanto en fase exponencial como en fase estacionaria. Las lecturas se realizaron mediante un barrido espectral de 400 a 700 nm de longitud de onda y como blanco de lectura se utilizó medio “F”. Se consideró el contenido de Chl-a en cada muestra analizada para obtener valores de absorbancia normalizados por unidad de Chl-a.

A partir del conjunto de datos obtenidos de las mediciones realizadas con el Junior-PAM, se calcularon los valores de la máxima tasa de transporte de electrones (ETR_{max}, por sus siglas en inglés), α (pendiente inicial de la curva), EK (irradiancia mínima de saturación) y F_v/F_m de acuerdo con el modelo de Eilers y Peeters (1988).

2.12 Composición proximal de las diatomeas *N. subinflatoides* y *N. thermalis*

2.12.1 Contenido de lípidos

La extracción de lípidos se realizó con una mezcla de cloroformo-metano-agua mediante el método de Blight y Dyer (1959) y la cuantificación de lípidos se realizó por el método de Pande *et al.* (1963). Además, se construyó una curva de calibración y se utilizó como estándar tripalmitina (99%).

2.12.2 Contenido de carbohidratos

La extracción de carbohidratos se llevó a cabo mediante el uso de ácido sulfúrico (H_2SO_4) de acuerdo con la metodología propuesta por Whyte (1987), la cuantificación se llevó a cabo mediante espectrofotometría a 485 nm por el método de Dubois *et al.* (1956). Además, se realizó una curva de calibración y se utilizó como estándar como glucosa (99%).

2.12.3 Contenido de proteínas

Para llevar a cabo la extracción de proteínas se siguió el método de Malara y charra (1972), para la cuantificación las muestras fueron leídas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm de acuerdo con la metodología descrita por Lowry (1951). Finalmente, se realizó una curva de calibración y se utilizó albúmina de bovino (98%) como estándar.

2.13 Composición de ácidos grasos

Para el análisis de ácidos grasos de los cultivos mantenidos en los tratamientos experimentales, se tomó una alícuota de 100 ml y se centrifugaron a 4500 rpm durante 5 min a 4 °C con una centrifuga Eppendorf 5810R. El paquete celular de las muestras fue congelado a -80 °C y liofilizado con un equipo Labconco, Freezone 2.5 a -50 °C y 0.11 kg cm^{-2} de presión. Para llevar a cabo la extracción de los ácidos grasos, se utilizaron 50 mg de muestra liofilizada de cada condición experimental. Los lípidos totales fueron extraídos mediante la metodología descrita por Folch *et al.* (1957) y se utilizó una solución extractora de diclorometano-metanol (2:1) más butilhidroxitolueno (BHT) al 0.01% como antioxidante. La metilación se realizó con un reactivo de esterificación (trifloruro de boro en metanol al 14%) de acuerdo con el método de Metcalfe *et al.* (1966). Como estándar se utilizó 37 component supelco FAME mix Sigma.

Se utilizó un cromatógrafo de gases (GC Agilent Technologies 7890A), equipado con una columna capilar (Agilent J&W, 123-3232 DB-FFAP) (30 m de longitud, 0.32 mm de diámetro, 0.25 μm grosor

de la película), y con un detector de ionización de flama (250 °C) e hidrógeno como gas de acarreo para la identificación de los ácidos grasos. La identificación se llevó a cabo mediante la comparación de los tiempos de retención relativos del estándar.

2.14 Tratamiento estadístico de los resultados

Para llevar a cabo los análisis estadísticos primero fueron evaluados los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Si los supuestos se cumplían, se procedió por la vía paramétrica. De no cumplirse se utilizaría un modelo apropiado no paramétrico.

Las diferencias en la densidad celular de bacterias heterotróficas, densidad celular de *Vibrio* spp., densidad celular de diatomeas (vía: tiempo) y composición de ácidos grasos (vía: especie de *Vibrio*) fueron comparados para cada caso mediante un análisis de varianza de una vía.

Para el resto de las variables (tamaño celular, peso seco orgánico, lípidos, proteínas, carbohidratos, pigmentos y fotosíntesis) las diferencias fueron comparadas para cada caso, por medio de un análisis de varianza de dos vías (especies de *Vibrio* y fases de crecimiento).

Cuando se evaluaron diferencias significativas entre los tratamientos, se utilizó la prueba *a posteriori* de Tukey. El nivel de confianza utilizado en las pruebas estadísticas antes descritas fue del 95% con un $\alpha = 0.05\%$. Los datos fueron procesados en el programa estadístico Statistica versión 7.0.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Caracterización de la curva de crecimiento de *N. subinflatoides*

Para la caracterización de la curva de crecimiento de la diatomea *N. subinflatoides* se siguió el crecimiento del cultivo durante 12 días, en donde se alcanzó una densidad máxima de 3.04×10^5 células mL⁻¹ al quinto día (Figura 2A). El cultivo de *N. subinflatoides* presentó una fase exponencial entre los días del 1 al 5 y no presentó una fase estacionaria de manera clara, ya que como se observa en la Figura 1A, a partir del día 6 hay una disminución de la densidad celular. Se realizó el seguimiento del crecimiento de *N. subinflatoides* mediante espectrofotometría y se observó que alcanzó una densidad óptica de 0.176 (Figura 2B). Los valores de pH de los cultivos muestran que oscilaron entre valores de 8.31 y 9.66 (Figura 2C). La temperatura de los cultivos se midió cada día y se encontró en valores de 22 ± 1 °C.

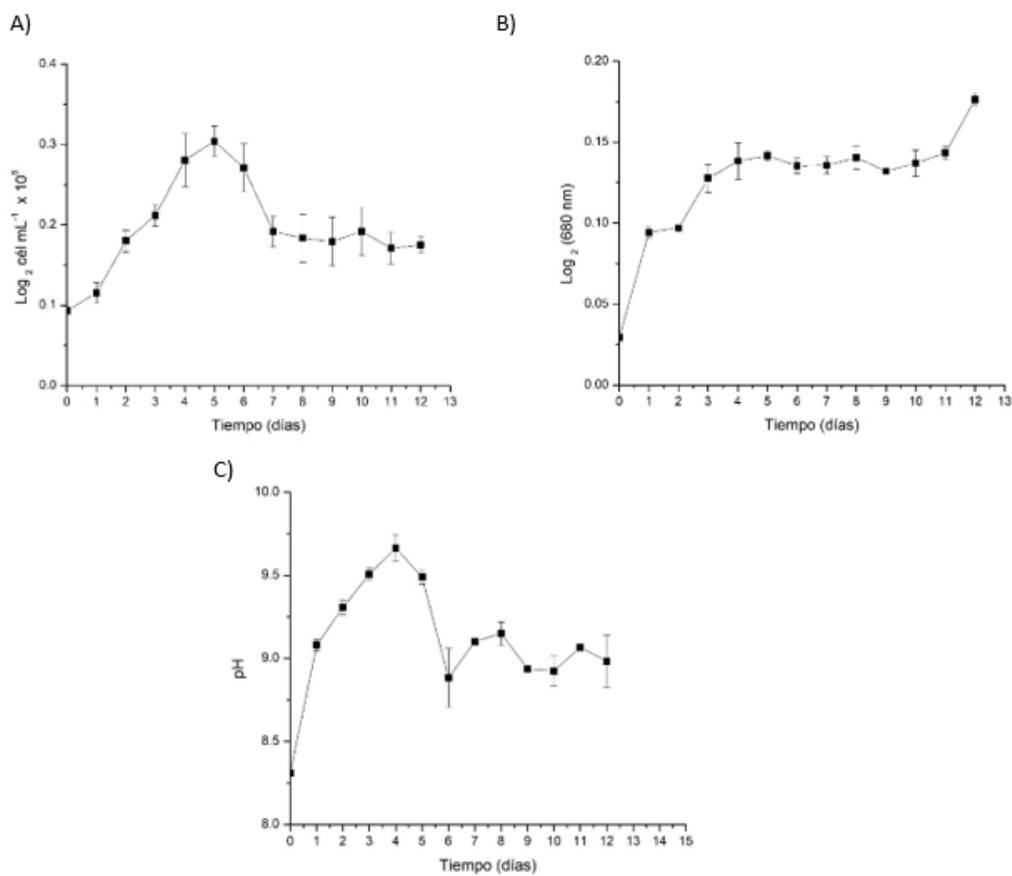


Figura 2. Caracterización del crecimiento de *Navicula subinflatoides*. A) Conteos celulares; B) Densidad óptica; C) pH. Los datos muestran los valores promedio (n=3) y desviación estándar.

A partir de los conteos celulares se calculó la tasa de crecimiento (μ) en la fase exponencial y se obtuvo un valor promedio de $0.34 \text{ div día}^{-1}$, para la tasa de generación el valor promedio obtenido fue de 2.93 días.

3.2 Inhibición del crecimiento de *Vibrio* spp. por *N. subinflatooides*

3.2.1 Crecimiento de *N. subinflatooides* en cocultivo con *Vibrio* spp.

Previo a realizar la inoculación con *Vibrio* spp., los cultivos de la diatomea *N. subinflatooides* resultaron estar libres de bacterias del tipo *Vibrio*, esto se comprobó a partir de realizar filtrados de 1 y 10 mL de los cultivos. Los ensayos de inhibición con *N. subinflatooides* se siguieron durante 8 días, tiempo en el cual la diatomea alcanzó la fase estacionaria. Las densidades celulares máximas alcanzadas por *N. subinflatooides* en cocultivo con *V. alginolyticus* ($0.35 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$) y *V. campbellii* ($0.31 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$) presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al tratamiento control. La densidad celular máxima del cultivo de *N. subinflatooides* en cocultivo con *V. harveyi* ($0.57 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$) no presentó diferencias significativas respecto al tratamiento control ($0.52 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$) ($p > 0.05$) (Figura 3A).

Se evaluó la densidad celular de los cultivos con y sin *Vibrio* spp. mediante espectrofotometría a 680 nm de longitud de onda. El cultivo de *N. subinflatooides* cocultivado con *V. campbellii* presentó diferencias significativas en la densidad celular con respecto al tratamiento control ($p < 0.05$), los tratamientos de *N. subinflatooides* en cocultivo con *V. harveyi* y *V. alginolyticus* no presentaron diferencias significativas con respecto al tratamiento control (*N. subinflatooides*) ($p > 0.05$) (Figura 3B).

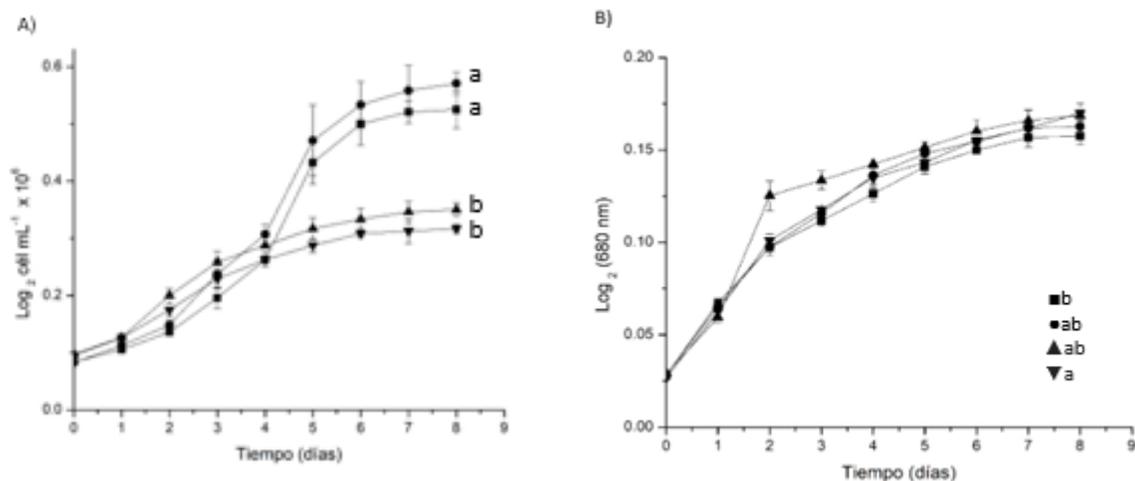


Figura 3. Curvas de crecimiento de *Navicula subinflatoides* A) conteos celulares; B) Densidad óptica. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de *N. subinflatoides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. *Navicula subinflatoides* (■), *Navicula subinflatoides* + *V. harveyi* (●), *Navicula subinflatoides* + *V. alginolyticus* (▲), *Navicula subinflatoides* + *V. campbellii* (▼).

Los valores de la tasa de crecimiento y tiempo de generación de *N. subinflatoides* en presencia y ausencia de *Vibrio* spp. se muestran en la Tabla 2. La mayor tasa de crecimiento se presentó en el tratamiento de *N. subinflatoides* en cocultivo con *V. alginolyticus* (0.51 divisiones día⁻¹), mientras que, la menor tasa de crecimiento se dio en el tratamiento control (0.34 divisiones día⁻¹). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la tasa de crecimiento de *N. subinflatoides* en cocultivo con *V. alginolyticus* y con respecto a los valores evaluados para el tratamiento control ($p < 0.05$). Los valores del tiempo de generación de *N. subinflatoides* en presencia de las tres especies de *Vibrio* tuvieron diferencias significativas respecto al tratamiento control ($p < 0.05$).

Se midió la longitud de las células de *N. subinflatoides* en cocultivo con cada una de las tres especies de *Vibrio*, las mediciones del tamaño de las células fueron comparadas entre los tratamientos y además con los valores al inicio del experimento (día 0). No se encontró cambio en el tamaño de las células por efecto del tratamiento o bien por efecto de las fases de crecimiento ($p > 0.05$).

Tabla 2. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento en fase exponencial, tasa de generación y tamaño celular de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp.

Tratamiento	Tasa de crecimiento	Tiempo de generación	Tamaño celular (día 8)	
	(μ : divisiones día ⁻¹)	(Tg: días)	Longitud	Ancho
<i>Navicula subinflatooides</i>	0.34 ± 0.02 c	2.90 ± 0.17 a	14.74 ± 1.08 a	5.76 ± 1.12 a
<i>N. subinflatooides</i> + <i>Vibrio harveyi</i>	0.42 ± 0.04 b	2.38 ± 0.23 b	14.96 ± 1.37 a	6.11 ± 0.96 a
<i>N. subinflatooides</i> + <i>V. alginolyticus</i>	0.51 ± 0.06 a	1.97 ± 0.28 c	14.49 ± 1.38 a	5.80 ± 0.59 a
<i>N. subinflatooides</i> + <i>V. campbellii</i>	0.42 ± 0.01 b	2.33 ± 0.09 b	14.42 ± 1.05 a	5.89 ± 0.96 a

Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c.

3.2.2 Efecto inhibitorio de *N. subinflatooides* contra *Vibrio* spp.

La inhibición del crecimiento de *V. harveyi* se presentó a las 48 h después de inocular los cultivos (Figura 4). Al inicio del ensayo de inhibición los cultivos presentaron concentraciones mayores a 1×10^2 *Vibrio* mL⁻¹, pasadas 48 h la concentración de *V. harveyi* fue en promedio de 26 *Vibrio* mL⁻¹ y a las 96 h los niveles de *V. harveyi* fueron indetectables. El efecto inhibitorio de *Vibrio* se mantuvo hasta el día 7 del ensayo. Se evaluaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en las concentraciones iniciales de *Vibrio* respecto a las evaluadas a las 48 h.

El control de *V. harveyi* cultivado en medio "F" mantuvo su densidad desde el inicio del experimento hasta el final del reto de inhibición, lo que demuestra que *V. harveyi* tiene la capacidad para crecer en este medio de cultivo.

La concentración inicial de bacterias heterotróficas fue de 3.09×10^6 UFC mL⁻¹, posteriormente, a las 48 h, tiempo en el que se presentó una inhibición mayor al 90% de *V. harveyi*, la concentración de bacterias heterotróficas registrada fue de 7.74×10^6 UFC mL⁻¹, finalmente, la concentración de estas bacterias durante el día 7 del ensayo fue de 6.23×10^6 UFC mL⁻¹ (Figura 4).

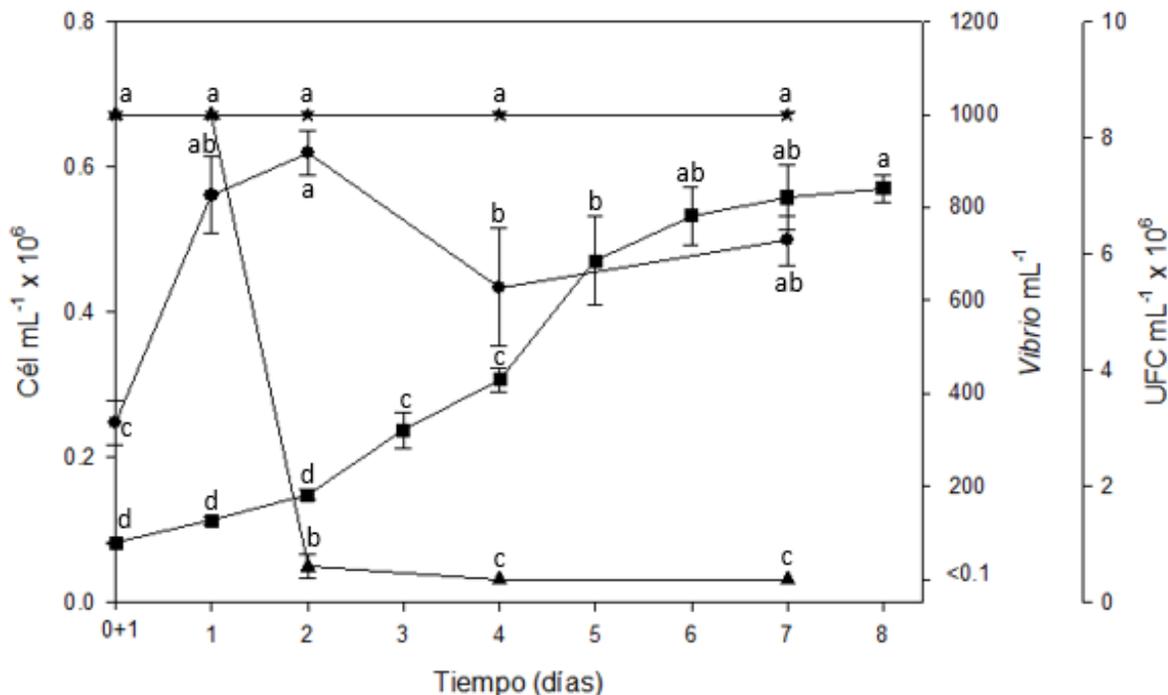


Figura 4. Reto de inhibición de *Navicula subinflatooides* contra *Vibrio harveyi*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: *V. harveyi* (Vibrio mL⁻¹: (▲), *V. harveyi* en tratamiento control (Vibrio mL⁻¹: (★) y bacterias heterotróficas (UFC mL⁻¹) (●) cocultivadas con *N. subinflatooides* (cél mL⁻¹) (■)). Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d.

Al igual que en los ensayos de *V. harveyi*, el tiempo en el que *N. subinflatooides* logró inhibir el crecimiento de *V. alginolyticus* fue de 48 h; sin embargo, para este caso los niveles fueron indetectables (Figura 5). El efecto inhibitorio de *N. subinflatooides* se presentó durante la fase exponencial y este se mantuvo hasta el día 7 del ensayo. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en las concentraciones iniciales de Vibrio mL⁻¹ y las concentraciones presentadas a partir del día 2 (Figura 5).

El control de *V. alginolyticus* logró crecer en medio "f", la densidad inicial se mantuvo hasta el día 4, y para el día 7 se presentó una disminución en la densidad celular de *V. alginolyticus* alrededor del 80% (Figura 5).

La concentración de bacterias heterotróficas mostró una concentración inicial de 1.36×10^6 UFC mL⁻¹, para el día 2, tiempo en el que se observó la inhibición total de *V. alginolyticus*, la concentración

de bacterias heterotróficas fue de 5.97×10^6 UFC mL⁻¹, mientras que para el día 7 la concentración fue de 7.36×10^6 UFC mL⁻¹ (Figura 5).

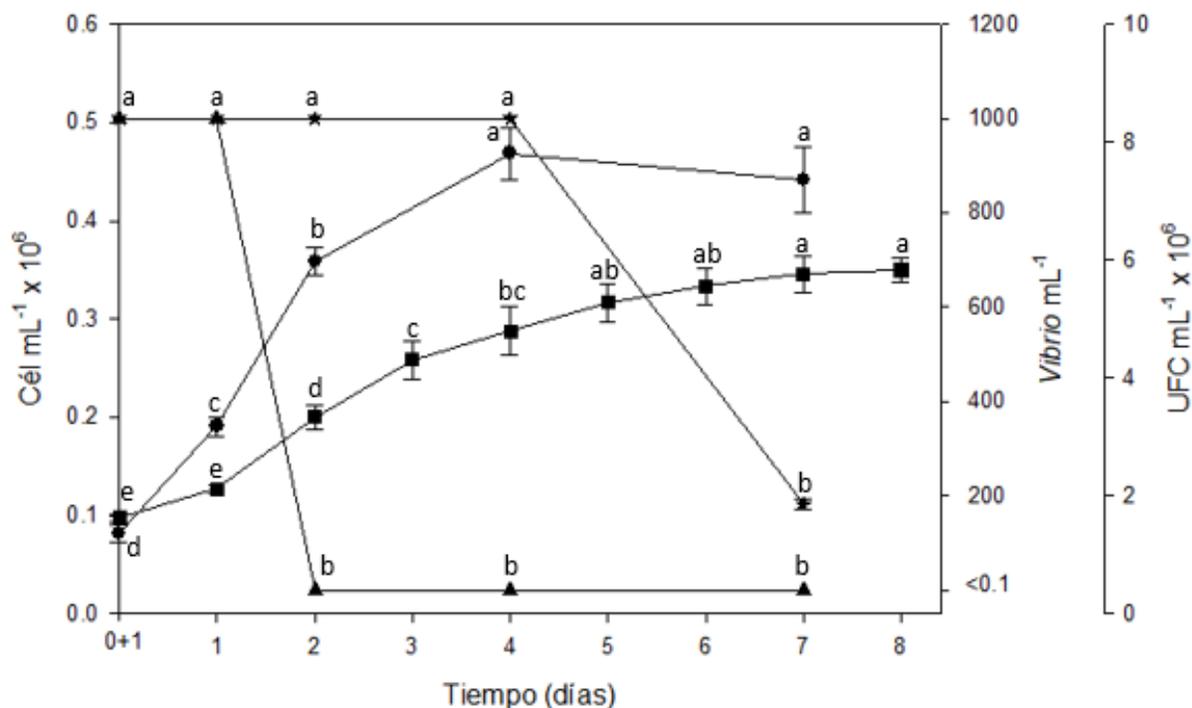


Figura 5. Reto de inhibición de *Navicula subinflatooides* contra *Vibrio alginolyticus*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: *V. alginolyticus* (Vibrio mL^{-1} : (▲)), *V. alginolyticus* en tratamiento control (Vibrio mL^{-1} : (★) y bacterias heterotróficas (UFC mL^{-1}) (●) cocultivadas con *N. subinflatooides* (cél mL^{-1}) (■). Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: $a>b>c>d>e$.

A diferencia de los cocultivos de *N. subinflatooides* con *V. harveyi* o *V. alginolyticus* la inhibición de *V. campbellii* se presentó hasta las 96 h, en donde se obtuvo un promedio de $2.33 \text{ Vibrio mL}^{-1}$ (Figura 6). La inhibición del patógeno se dio durante la fase de crecimiento exponencial de *N. subinflatooides* y el efecto inhibitorio permaneció hasta el día 7 de cultivo, día en el que se presentaron niveles indetectables de *V. campbellii*. Diferencias significativas ($p < 0.05$) se presentaron en las densidades iniciales de Vibrio mL^{-1} (día 0, 1 y 2) en comparación con las densidades celulares de los días 4 y 7.

El control de *V. campbellii* cultivado en medio "f" mantuvo su densidad desde el inicio del experimento hasta el final del reto de inhibición, lo que demuestra que *V. campbellii* tiene la capacidad para crecer en este medio de cultivo (Figura 6).

La concentración de bacterias heterotróficas al inicio del ensayo de inhibición fue de 1.11×10^6 UFC mL^{-1} , para el día 4, día donde se presentó una inhibición mayor al 95% de la de concentración de *V. campbellii*, la concentración de bacterias heterotróficas fue de 5.75×10^6 UFC mL^{-1} , mientras que al término del ensayo las bacterias heterotróficas tuvieron una concentración de 5.83×10^6 UFC mL^{-1} (Figura 6).

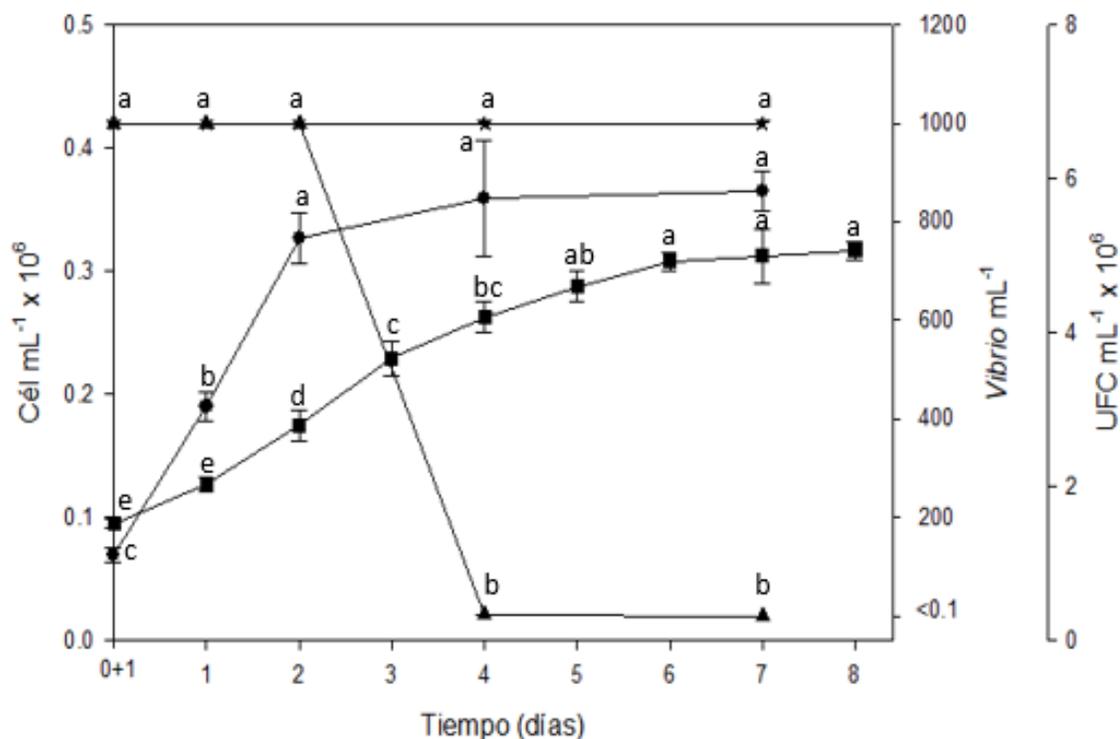


Figura 6. Reto de inhibición de *Navicula subinflatoides* contra *Vibrio campbellii*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: *V. campbellii* (Vibrio mL^{-1} : (▲), *V. campbellii* en tratamiento control (Vibrio mL^{-1} : (★) y bacterias heterotróficas (UFC mL^{-1}) (●) cocultivadas con *N. subinflatoides* (cél mL^{-1}) (■)). Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: $a>b>c>d>e$.

Los datos de las concentraciones de *Vibrio* spp. mostrados en los tres retos de inhibición corresponden a los filtrados de 10 mL, sin embargo, los filtrados de 1 mL presentaron tendencias muy similares a las obtenidas en los filtrados de muestras de mayor volumen (Figura 43-45).

3.2.3 Peso seco total, contenido de cenizas y peso seco orgánico de *N. subinflatoides*

El peso seco total mostró diferencias significativas durante la fase exponencial con la adición de *V. alginolyticus* y *V. campbellii* ($p < 0.05$), mientras que para *V. harveyi* no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$). Durante la fase estacionaria el peso seco total no presentó diferencias significativas ($p > 0.05$) por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*). El peso seco total evidenció diferencias significativas entre las fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se encontró una interacción significativa ($p < 0.05$) en el peso seco total por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento. El mayor valor de peso seco total en la fase exponencial se presentó en el tratamiento de *N. subinflatoides* en cocultivo con *V. harveyi* (1668.42 pg cél⁻¹), mientras que el mayor valor de peso seco total en fase estacionaria lo obtuvo el tratamiento con *V. campbellii* (592.05 pg cél⁻¹) (Figura 7).

Para el contenido de cenizas se presentaron diferencias significativas durante la fase exponencial con la adición de *V. campbellii* ($p < 0.05$), mientras que por la adición de *V. harveyi* y *V. alginolyticus* no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$). Durante la fase estacionaria el contenido de cenizas no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*). Se encontraron diferencias significativas en el contenido de cenizas entre las fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se presentó una interacción significativa ($p < 0.05$) en el contenido de cenizas por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento. El mayor contenido de cenizas en la fase exponencial se encontró en el tratamiento de *N. subinflatoides* en cocultivo con *V. harveyi* (1197.51 pg cél⁻¹), mientras que en la fase estacionaria el mayor contenido de cenizas se presentó en el tratamiento de *N. subinflatoides* en cocultivo con *V. alginolyticus* (315.00 pg cél⁻¹) (Figura 8).

El peso seco orgánico mostró diferencias significativas en la fase exponencial por la adición de *V. alginolyticus* y *V. campbellii* ($p < 0.05$), mientras que la adición de *V. harveyi* no presentó diferencias significativas en el peso seco orgánico ($p > 0.05$). Durante la fase estacionaria no se encontraron diferencias significativas para el peso seco orgánico ($p > 0.05$) por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*). El peso seco orgánico mostró diferencias entre ambas fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se presentó una interacción significativa ($p < 0.05$) en el peso seco orgánico por efecto de los distintos tratamientos y las fases

de crecimiento. El mayor contenido de peso seco orgánico en la fase exponencial se presentó en el tratamiento control (614.08 pg cél⁻¹), en tanto que para la fase estacionaria el valor mayor para peso seco orgánico fue (335.67 pg cél⁻¹) para *N. subinflatooides* en cocultivo con *V. campbellii* (Figura 9).

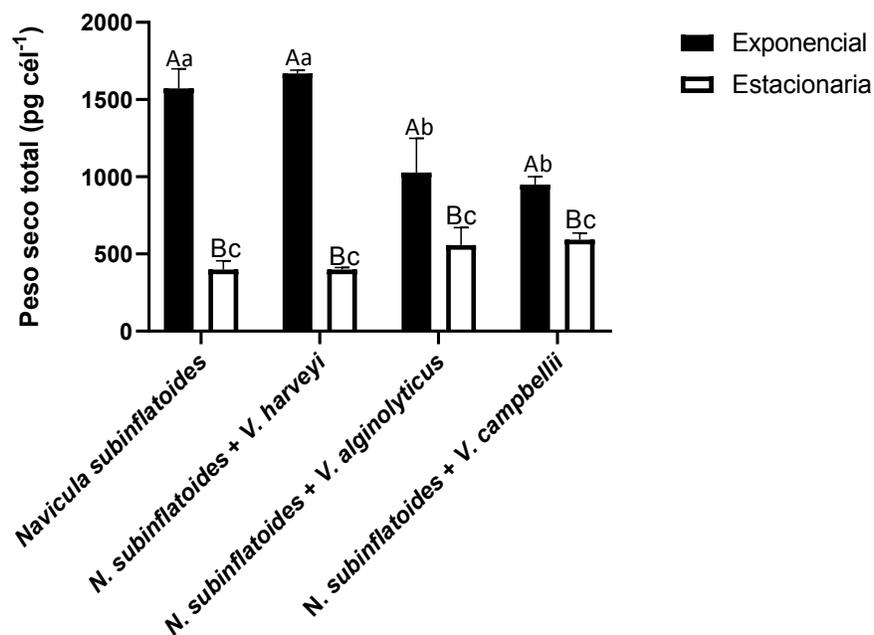


Figura 7. Valores promedio y desviación estándar del peso seco total de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B.

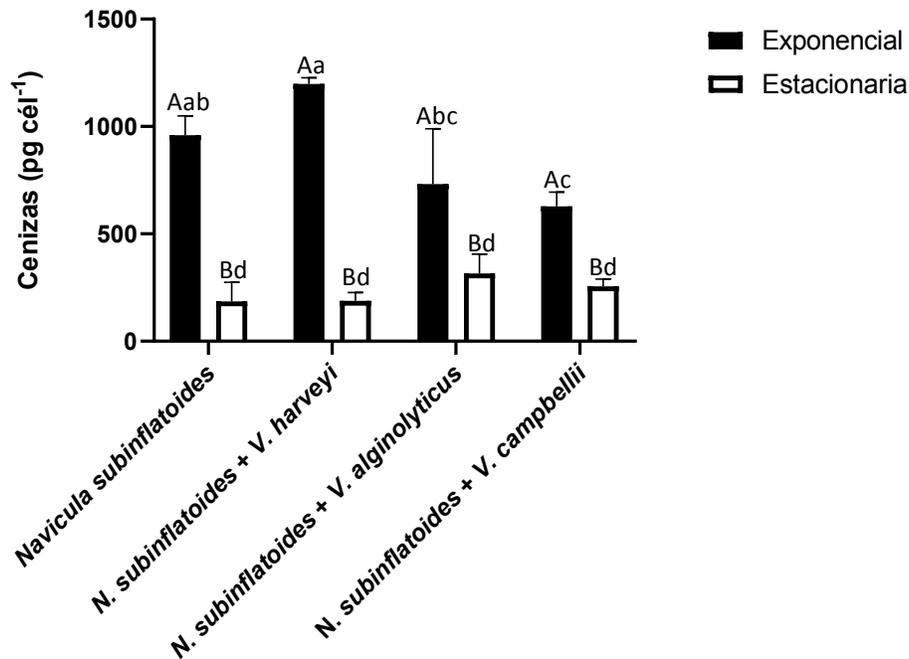


Figura 8. Valores promedio y desviación estándar del contenido de cenizas de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B.

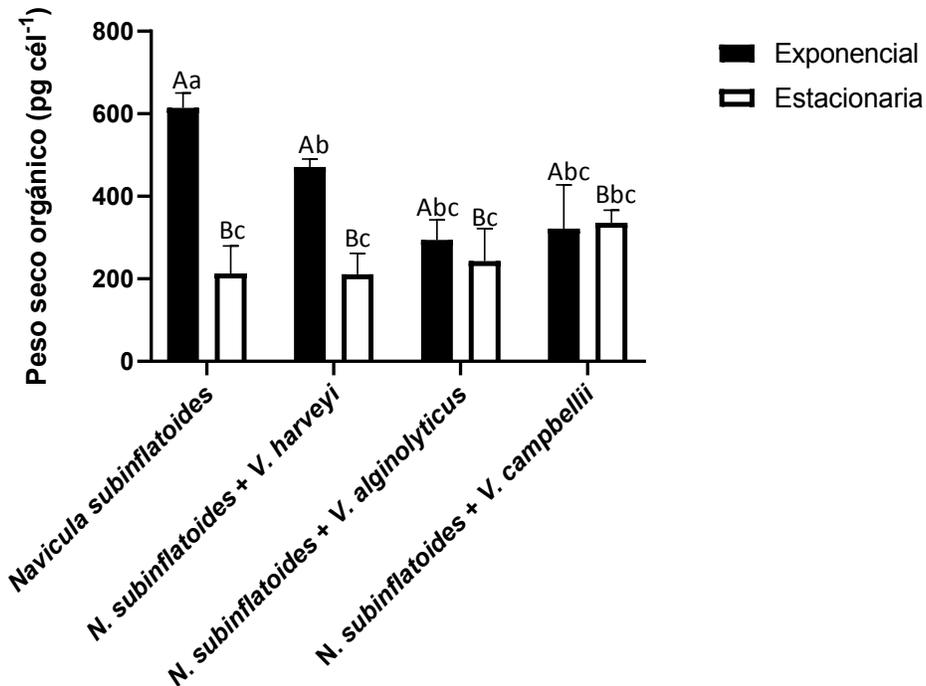


Figura 9. Valores promedio y desviación estándar del peso seco orgánico de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B.

3.2.4 Composición proximal de *N. subinflatoides*

El contenido de carbohidratos mostró diferencias significativas durante las fases exponencial y estacionaria con la adición de *V. alginolyticus* y *V. campbellii* ($p < 0.05$), mientras que para *V. harveyi* no se presentaron diferencias significativas en ambas fases de crecimiento ($p > 0.05$). El contenido de carbohidratos evidenció diferencias significativas entre las fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se encontró una interacción significativa ($p < 0.05$) en el contenido de carbohidratos por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento. El mayor contenido de carbohidratos en la fase exponencial se presentó en el cocultivo con *V. harveyi* ($35.84 \text{ pg cél}^{-1}$), mientras que para la fase estacionaria el mayor contenido de carbohidratos se presentó en el cocultivo con *V. campbellii* ($37.09 \text{ pg cél}^{-1}$) (Figura 10).

Para el contenido de lípidos se encontraron diferencias significativas durante la fase exponencial por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*) ($p < 0.05$). En cuanto a la fase estacionaria el contenido de lípidos mostró diferencias significativas con la adición de *V. alginolyticus* ($p < 0.05$). El contenido de lípidos presentó diferencias significativas entre ambas fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se evaluó una interacción significativa ($p < 0.05$) en el contenido de lípidos por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento. El mayor contenido de lípidos en la fase exponencial se presentó en el tratamiento control ($1818.03 \text{ pg cél}^{-1}$), para la fase estacionaria el cocultivo con *V. alginolyticus* presentó el mayor contenido de lípidos ($640.68 \text{ pg cél}^{-1}$) (Figura 11).

El contenido de proteínas presentó diferencias significativas en la fase exponencial por la adición de *V. alginolyticus* y *V. campbellii* ($p < 0.05$), por su parte, *V. harveyi* no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$). Durante la fase exponencial se encontraron diferencias significativas en el contenido de proteínas por la adición de *V. campbellii* ($p < 0.05$). El contenido de carbohidratos presentó diferencias significativas entre las fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se evaluó una interacción significativa ($p < 0.05$) en el contenido de proteínas por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento. El mayor contenido de proteínas en la fase exponencial se presentó en el tratamiento control ($1062.90 \text{ pg cél}^{-1}$), para la fase estacionaria el mayor contenido de proteínas se presentó en el cocultivo con *V. campbellii* ($897.03 \text{ pg cél}^{-1}$) (Figura 12).

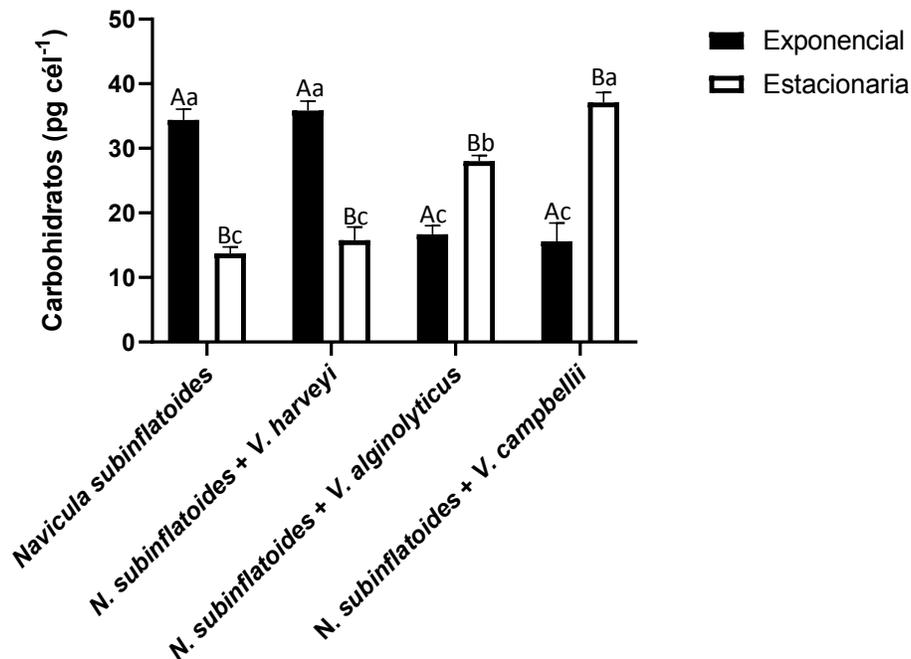


Figura 10. Valores promedio y desviación estándar del contenido de carbohidratos de *Navicula subinflatooides*, en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B.

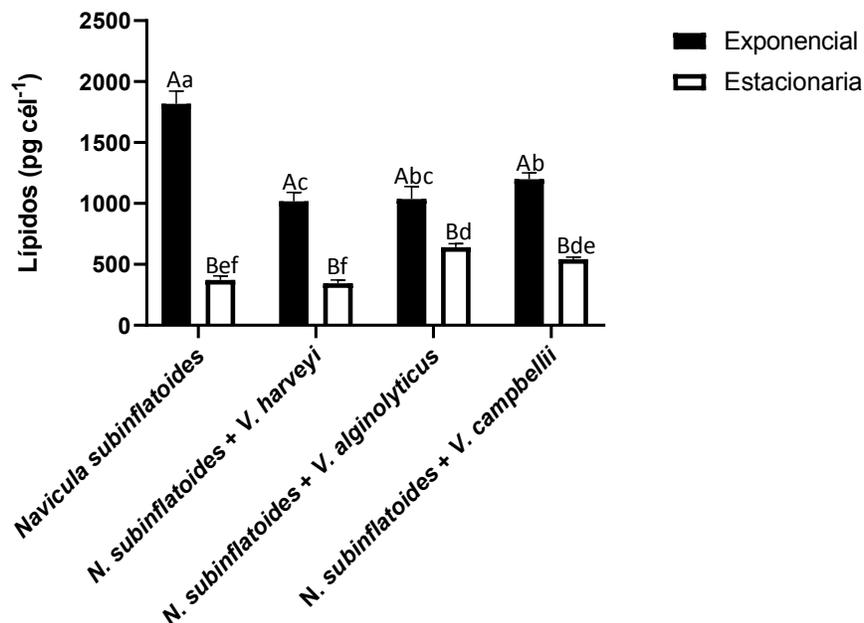


Figura 11. Valores promedio y desviación estándar del contenido de lípidos de *Navicula subinflatooides*, en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d>e>f. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B.

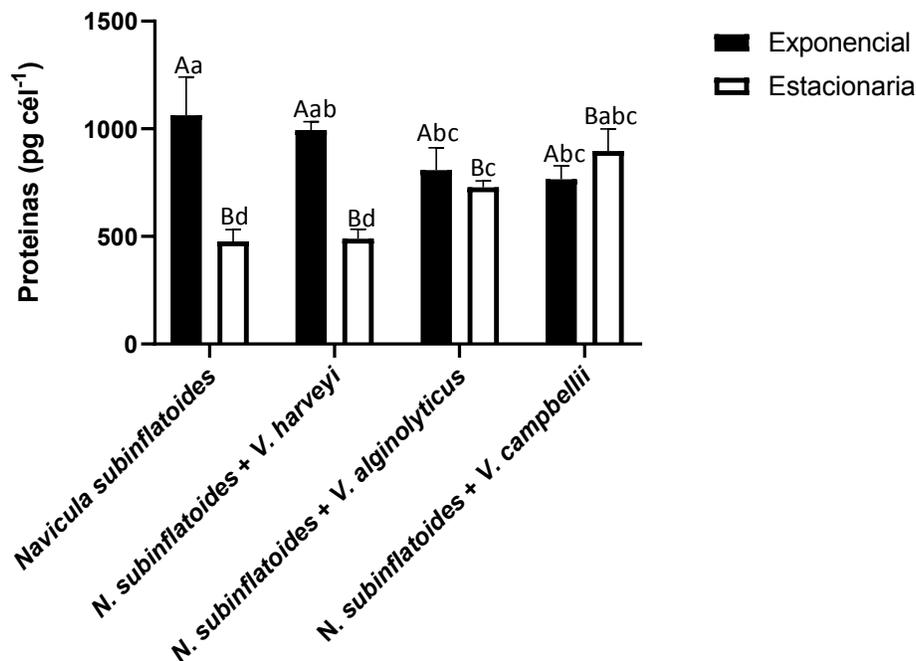


Figura 12. Valores promedio y desviación estándar del contenido de proteínas de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B.

3.2.5 Cuantificación de pigmentos de *N. subinflatooides*

Para la clorofila a (Chl-a) se presentaron diferencias significativas durante la fase exponencial por la adición de *V. alginolyticus* ($p < 0.05$), por su parte, *V. harveyi* y *V. campbellii* no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$). Durante la fase estacionaria se obtuvieron diferencias significativas por la adición de *V. alginolyticus* y *V. campbellii* ($p < 0.05$). El contenido de Chl-a evidenció diferencias significativas entre las fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se encontró una interacción significativa ($p < 0.05$) en el contenido de Chl-a por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento. El mayor contenido de Chl-a en la fase exponencial se presentó en el tratamiento control (0.81 pg cél^{-1}), mientras que para la fase estacionaria el mayor contenido de Chl-a se presentó en el cocultivo con *V. campbellii* (0.79 pg cél^{-1}) (Figura 13).

El contenido de clorofila c (Chl-c) presentó diferencias significativas durante las fases exponencial y estacionaria por la adición de *V. alginolyticus* y *V. campbellii* ($p < 0.05$), en el caso de *V. harveyi* no se presentaron diferencias significativas en ambas fases de crecimiento ($p > 0.05$). El contenido de Chl-c mostró diferencias significativas entre las fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se presentó una interacción significativa en el contenido de Chl-c por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento ($p < 0.05$). El mayor contenido de Chl-c durante la fase exponencial se presentó en el tratamiento control (0.13 pg cél^{-1}), mientras que en la fase estacionaria el mayor contenido de Chl-c se presentó en el cocultivo con *V. campbellii* (0.25 pg cél^{-1}) (Figura 14).

El contenido de carotenos (car) no mostró diferencias significativas durante la fase exponencial ($p > 0.05$). Para la fase estacionaria se presentaron diferencias significativas para el contenido de car por la adición de *V. alginolyticus* y *V. campbellii* ($p < 0.05$), en tanto para *V. harveyi* no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$). El contenido de car presentó diferencias significativas entre las fases de crecimiento ($P < 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se evaluó una interacción significativa ($p < 0.05$) en el contenido de car por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento. El mayor contenido de car durante las fases exponencial y estacionaria se presentó en el cocultivo con *V. campbellii* al obtenerse valores de 0.29 pg cél^{-1} y 0.25 pg cél^{-1} , respectivamente (Figura 15).

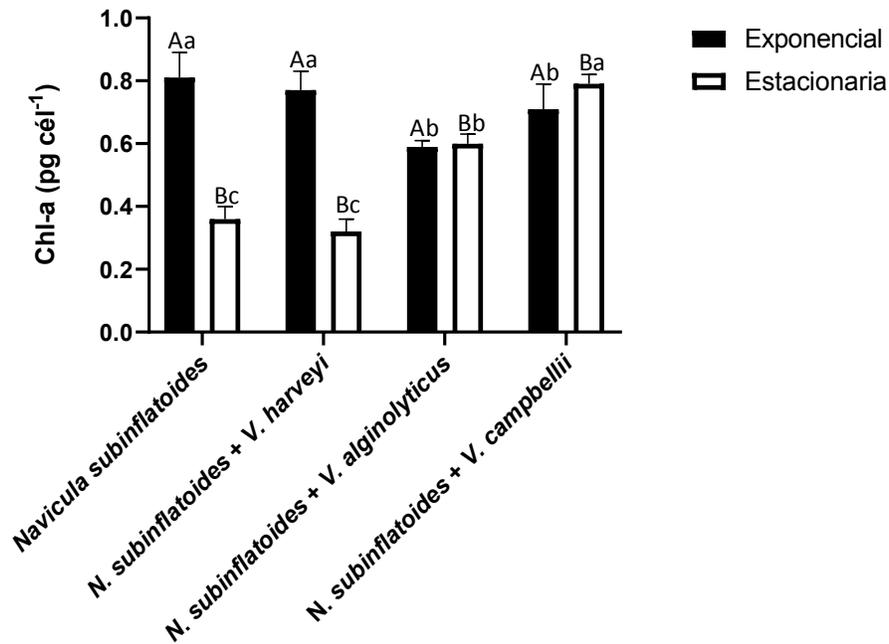


Figura 13. Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila a (Chl-a) de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B.

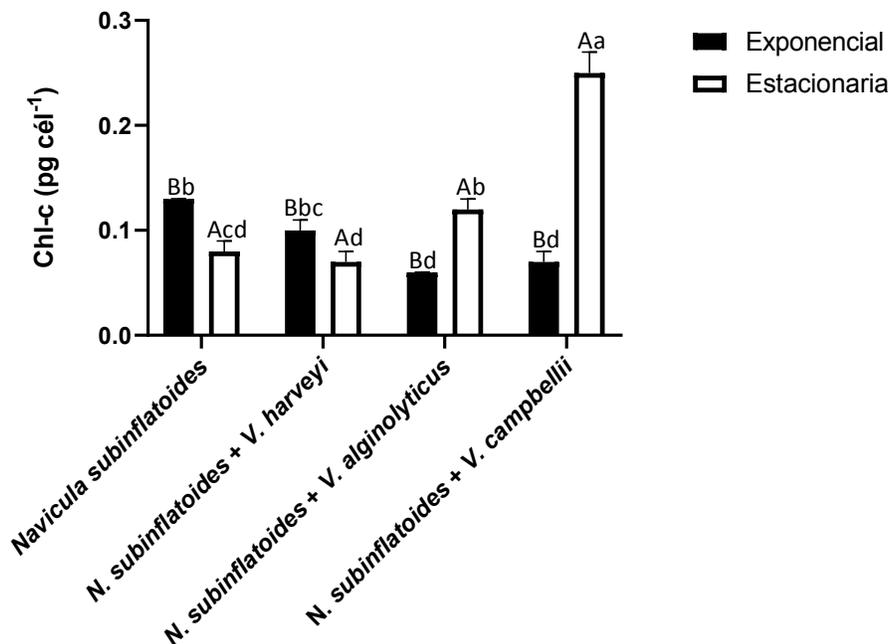


Figura 14. Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila c (Chl-c) de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B.

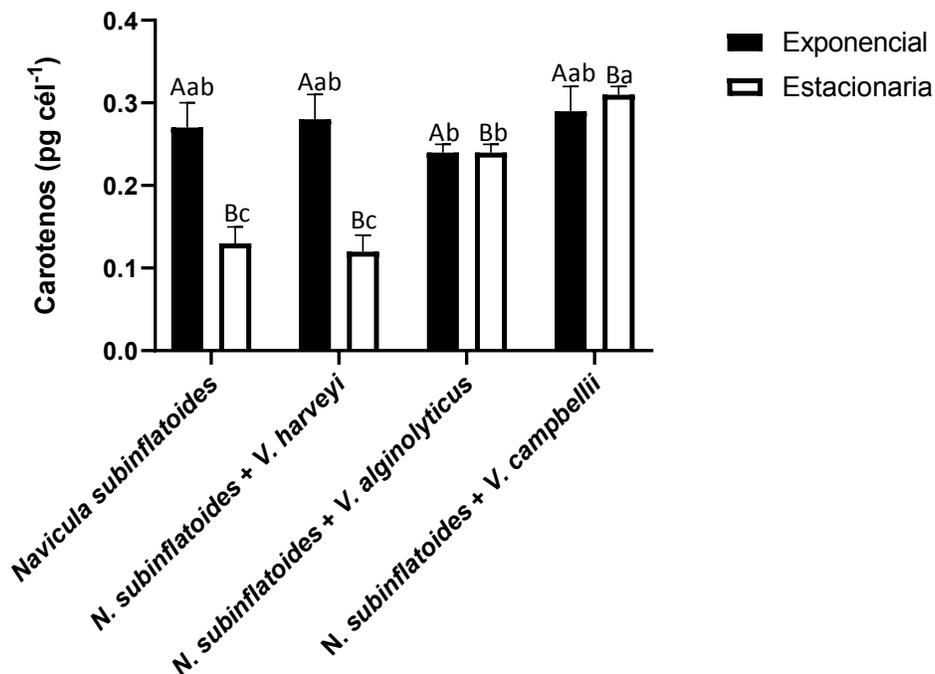


Figura 15. Valores promedio y desviación estándar del contenido de carotenos (car) de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: $a>b>c$. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: $A>B$.

3.2.6 Parámetros fotosintéticos de *N. subinflatooides*

Para la pendiente inicial (α) de las curvas de fotosíntesis se presentaron diferencias significativas durante la fase exponencial por la adición de *V. alginolyticus* ($p < 0.05$), por su parte la presencia de *V. harveyi* y *V. campbellii* no mostraron diferencias significativas en la pendiente inicial ($p > 0.05$). En cuanto a la fase estacionaria no se presentaron diferencias significativas por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*) ($p > 0.05$). Se encontraron diferencias significativas en el valor de α entre las fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se encontró una interacción significativa en α por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento ($p < 0.05$). El mayor valor para α en la fase exponencial se presentó en el cocultivo con *V. alginolyticus* (0.104), mientras que en la fase estacionaria el cocultivo con *V. harveyi* presentó el mayor valor de α (0.063) (Figura 16).

La tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}) mostró diferencias significativas durante las fases exponencial y estacionaria por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*) ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas para ETR_{max} entre las fases de crecimiento ($p > 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se presentó una interacción significativa en ETR_{max} por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento ($p < 0.05$). El mayor valor de ETR_{max} en la fase exponencial se presentó en el cocultivo con *V. alginolyticus* (78.47), para la fase estacionaria el mayor valor de ETR_{max} se presentó en el cocultivo con *V. harveyi* (78.36) (Figura 17).

La irradiancia de saturación (E_k) presentó diferencias significativas durante las fases exponencial y estacionaria por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*) ($p < 0.05$). Se encontraron diferencias significativas para E_k entre las fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se evaluó una interacción significativa en E_k por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento ($p < 0.05$). El mayor valor para E_k en la fase exponencial se presentó en el cocultivo con *V. campbellii* (845.83), durante la fase estacionaria el mayor valor para E_k se obtuvo en el cocultivo con *V. harveyi* (1321.90) (Figura 18).

Para la eficiencia cuántica (F_v/F_m) no se presentaron diferencias significativas durante ambas fases de crecimiento por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*) ($p > 0.05$). Se mostraron diferencias significativas para F_v/F_m entre las fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos. Para F_v/F_m no se presentó una interacción significativa por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento ($p > 0.05$). El mayor valor para F_v/F_m en la fase exponencial se presentó para el cocultivo con *V. alginolyticus* (0.62), para la fase estacionaria el mayor valor de F_v/F_m fue de 0.40 correspondiente al cocultivo con *V. campbellii* (Figura 19).

En la figura 20 se muestran las curvas de fotosíntesis-irradiancia (ETR) correspondientes a los cocultivos de *N. subinflatooides* tanto en fase exponencial como en fase estacionaria. Se presentaron diferencias significativas por la adición de *V. alginolyticus* y *V. campbellii* durante la fase exponencial ($p < 0.05$), mientras que, para la fase estacionaria se presentaron diferencias significativas por la adición de *V. harveyi* ($p < 0.05$). No se mostraron diferencias significativas para ETR entre fases de crecimiento ($p > 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se evaluó una interacción significativa en ETR

por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento ($p < 0.05$). Los resultados muestran que el cocultivo de *N. subinflatooides* con *V. alginolyticus* presenta la mayor eficiencia fotosintética durante la fase exponencial de crecimiento de *N. inflatooides*, en tanto que, para la fase estacionaria de crecimiento de la diatomea la mejor eficiencia fotosintética se presentó en el cocultivo con *V. harveyi*.

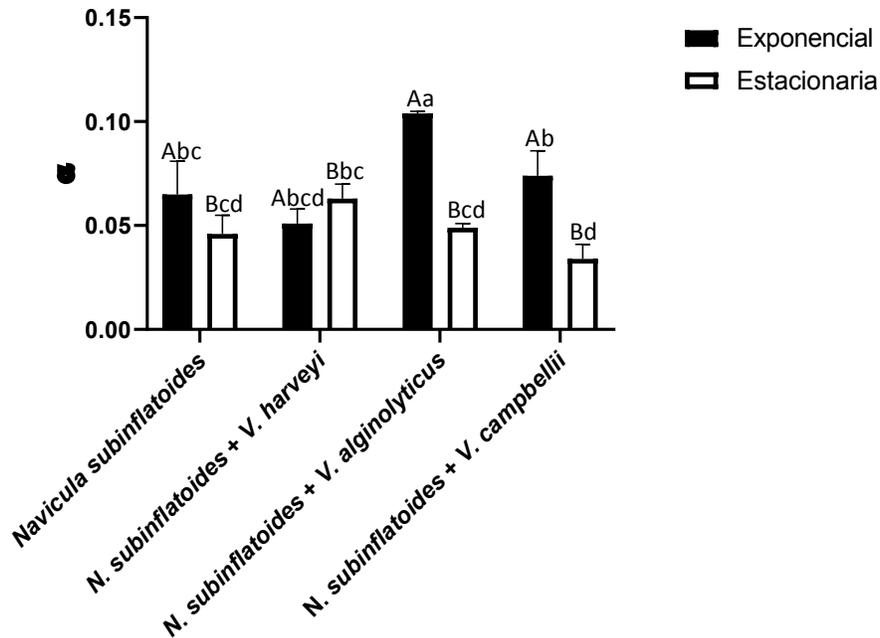


Figura 16. Valores promedio y desviación estándar de la pendiente inicial de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: $a>b>c>d$. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: $A>B$.

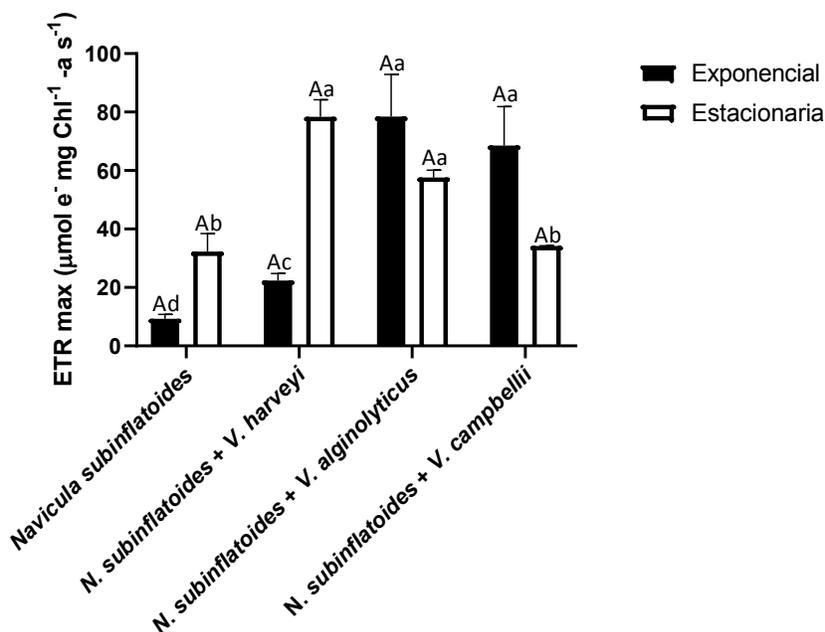


Figura 17. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de transporte de electrones de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: $a>b>c>d$. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: $A>B$.

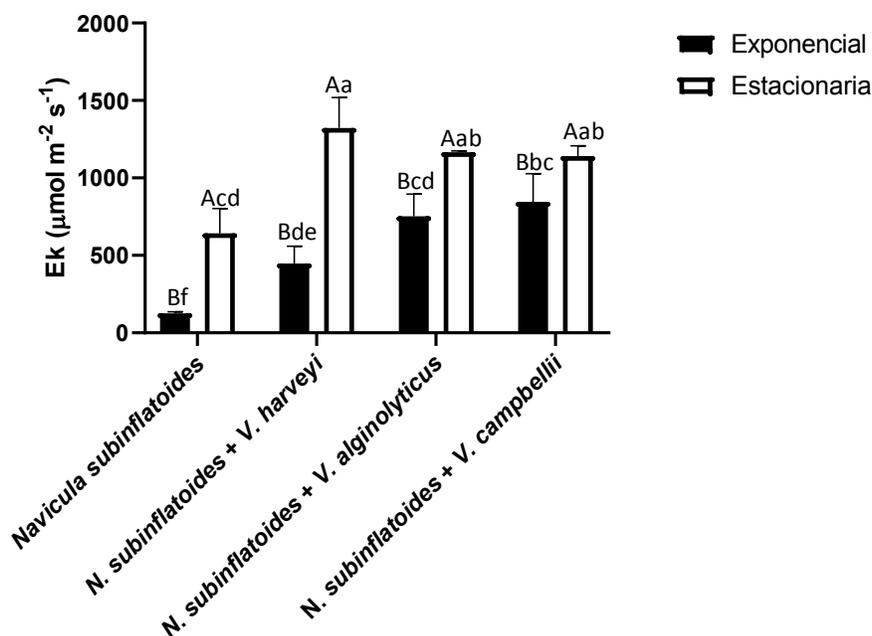


Figura 18. Valores promedio y desviación estándar de la irradiancia de saturación de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: $a>b>c>d>e>f$. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: $A>B$.

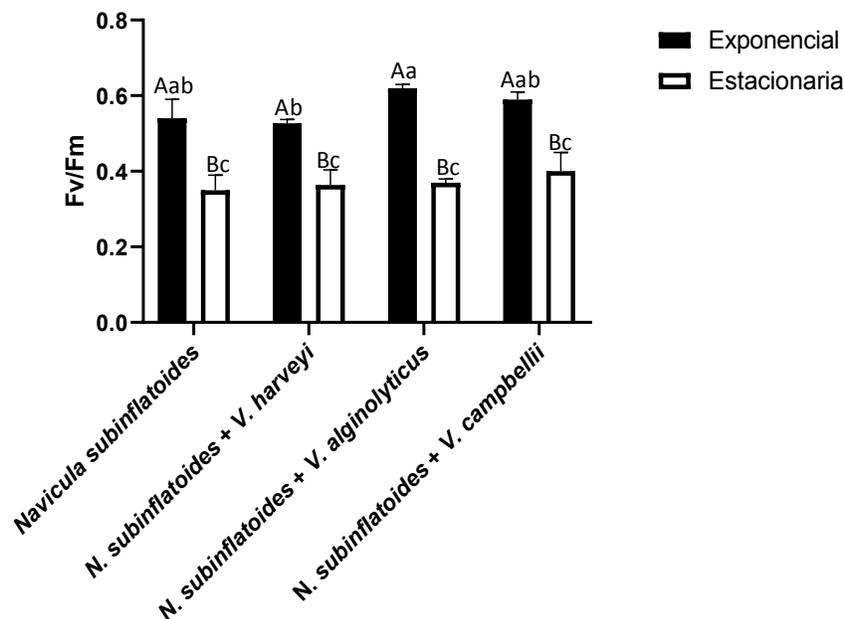


Figura 19. Valores promedio y desviación estándar de la eficiencia cuántica de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: $a>b>c$. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: $A>B$.

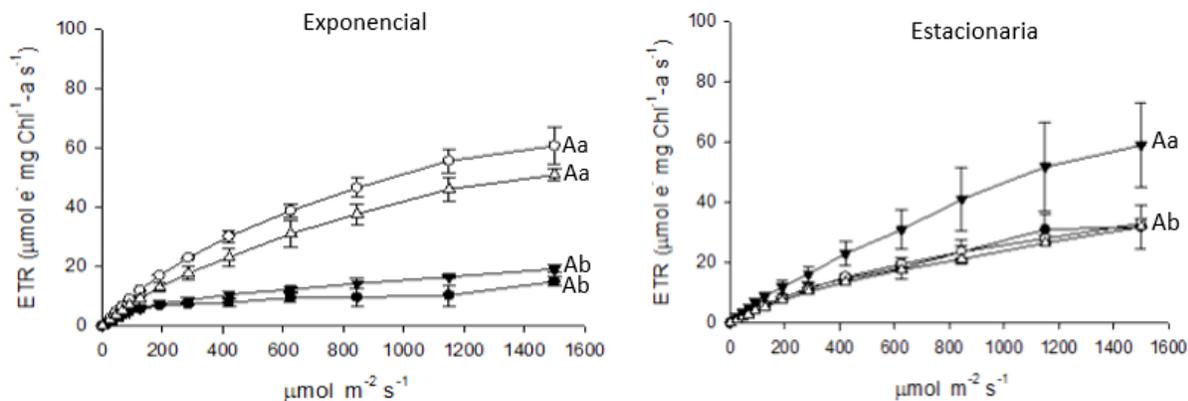


Figura 20. Curvas fotosintéticas medidas como tasa máxima de transporte de electrones de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria de crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: $a>b$. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: $A>B$. *N. subinflatooides* (●), *N. subinflatooides* + *V. harveyi* (▼), *N. subinflatooides* + *V. alginolyticus* (○), *N. subinflatooides* + *V. campbellii* (△).

3.2.7 Composición de ácidos grasos de *N. subinflatoides*

La composición de ácidos grasos de *N. subinflatoides* (en presencia o ausencia de *Vibrio* spp.) se muestran en la Tabla 3. En la mayoría de los ácidos grasos se presentaron diferencias significativas por la adición de *Vibrio* spp. Para todos los tratamientos, se presentó una disminución del contenido total de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) por la adición de las tres especies de *Vibrio* spp. (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*) (Figura 46).

Tabla 3. Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de ácidos grasos de *Navicula subinflatoides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase estacionaria de crecimiento.

Composición de ácidos grasos	<i>Navicula subinflatoides</i>	<i>N. subinflatoides</i> + <i>V. harveyi</i>	<i>N. subinflatoides</i> + <i>V. alginolyticus</i>	<i>N. subinflatoides</i> + <i>V. campbellii</i>
SFA				
C4:0	0.08 ± 0.01 c	0.10 ± 0.01 b	0.16 ± 0.01 a	0.15 ± 0.01 a
C6:0	ND	ND	0.11 ± 0.01 b	0.19 ± 0.02 a
C8:0	0.07 ± 0.00 c	0.16 ± 0.01 a	0.11 ± 0.01 b	0.10 ± 0.00 b
C10:0	4.18 ± 0.19 b	0.50 ± 0.01 c	6.06 ± 2.21 ab	7.44 ± 0.33 a
C11:0	0.01 ± 0.00 a	ND	ND	0.01 ± 0.00 a
C12:0	0.02 ± 0.00 b	0.06 ± 0.01 a	0.03 ± 0.01 b	0.02 ± 0.00 b
C13:0	5.94 ± 0.15 b	6.02 ± 0.42 b	7.05 ± 0.51 a	3.24 ± 0.20 c
C14:0	4.63 ± 0.03 b	4.63 ± 0.32 b	5.76 ± 0.48 a	4.28 ± 0.07 b
C15:0	0.18 ± 0.01 b	0.23 ± 0.02 a	0.15 ± 0.01 bc	0.12 ± 0.01 c
C16:0	13.66 ± 0.49 a	14.16 ± 0.89 a	12.58 ± 0.78 a	12.93 ± 1.07 a
C17:0	7.06 ± 0.23 a	7.27 ± 0.50 a	6.68 ± 0.34 ab	5.90 ± 0.14 b
C18:0	0.52 ± 0.01 b	3.21 ± 0.24 a	0.67 ± 0.07 b	0.82 ± 0.08 b
C20:0	0.04 ± 0.00 b	0.11 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 b	0.03 ± 0.00 b
C21:0	0.70 ± 0.04 b	0.84 ± 0.06 a	0.71 ± 0.01 b	0.61 ± 0.03 b
C22:0	ND	0.05 ± 0.00 a	ND	0.03 ± 0.00 b
C23:0	0.04 ± 0.01 b	0.09 ± 0.02 a	0.04 ± 0.00 b	0.04 ± 0.00 b
C24:0	0.07 ± 0.01 ab	0.09 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 c	0.06 ± 0.00 b
MUFA				
C14:1	0.03 ± 0.00 c	0.11 ± 0.01 a	0.08 ± 0.01 b	0.03 ± 0.00 c
C15:1	0.04 ± 0.00 a	0.04 ± 0.00 ab	0.03 ± 0.00 b	0.03 ± 0.00 b
C16:1	27.66 ± 0.59 b	31.94 ± 1.44 a	25.65 ± 1.63 b	34.68 ± 0.34 a
C17:1	ND	0.08 ± 0.01 a	ND	0.04 ± 0.01 b
C18:1n9 C	0.66 ± 0.05 b	2.08 ± 0.17 a	0.82 ± 0.16 b	0.70 ± 0.04 b
C18:1n9 T	2.58 ± 0.12 a	2.82 ± 0.21 a	2.70 ± 0.79 a	3.01 ± 0.05 a
C20:1n9	0.07 ± 0.01 c	0.15 ± 0.00 a	0.11 ± 0.02 b	0.11 ± 0.01 ab
C22:1n9	0.81 ± 0.04 a	0.82 ± 0.10 a	0.73 ± 0.04 a	0.77 ± 0.05 a
C24:1n9	0.05 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 b	0.02 ± 0.02 b	0.04 ± 0.00 a
PUFA				
C18:2n6 C	0.47 ± 0.02 b	0.63 ± 0.08 a	0.60 ± 0.05 ab	0.58 ± 0.06 ab
C18:2n6 T	0.41 ± 0.01 a	0.40 ± 0.04 a	0.45 ± 0.02 a	0.40 ± 0.03 a
C18:3n3	0.60 ± 0.01 b	1.06 ± 0.10 a	1.06 ± 0.09 a	0.71 ± 0.05 b
C18:3n6	0.22 ± 0.02 a	0.18 ± 0.02 ab	0.20 ± 0.03 ab	0.16 ± 0.01 b
C20:2	ND	0.03 ± 0.00 b	0.14 ± 0.01 a	0.03 ± 0.00 b

Tabla 3. Continuación...

C22:2	0.06 ± 0.00 c	0.15 ± 0.02 a	0.11 ± 0.02 bc	0.14 ± 0.03 ab
C20:3n3	0.21 ± 0.01 a	0.10 ± 0.01 b	0.09 ± 0.02 b	0.01 ± 0.00 c
C20:3n6	0.10 ± 0.00 ab	0.13 ± 0.01 a	0.11 ± 0.02 ab	0.08 ± 0.01 c
C20:4n6 ARA	0.57 ± 0.03 b	0.69 ± 0.05 a	0.59 ± 0.01 b	0.50 ± 0.03 b
C20:5n3 EPA	28.25 ± 0.64 a	21.12 ± 1.71 b	26.24 ± 0.99 a	21.95 ± 0.71 b
C22:6n3 DHA	0.03 ± 0.00 c	ND	0.18 ± 0.00 a	0.09 ± 0.01 b
Total				
ΣSFA	37.18	37.51	40.17	35.93
ΣMUFA	31.90	38.07	30.14	39.42
ΣPUFA	30.92	24.49	29.75	24.65

Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c. T: trans; C: cis; SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; ND: no detectado.

3.3 Caracterización de la curva de crecimiento de *N. thermalis*

La caracterización del crecimiento de *N. thermalis* se siguió por 16 días. La densidad máxima fue de 1.73×10^6 cél mL⁻¹ como se muestra en la Figura 21A. La fase exponencial se presentó durante los días 1 al 11 y la fase estacionaria durante los días 12 al 14 (Figura 21A). Con las mediciones de espectrofotometría a una longitud de onda de 680 nm, el valor máximo obtenido fue de 0.393 (Figura 21B). Los valores de pH del cultivo se mantuvieron entre 8.11 y 9.27 (Figura 21C). La temperatura de los cultivos se midió cada día y se mantuvo en valores promedio de 22 ± 1 °C. La tasa de crecimiento fue de 0.34 divisiones día⁻¹ y el tiempo de generación fue de 2.93 días.

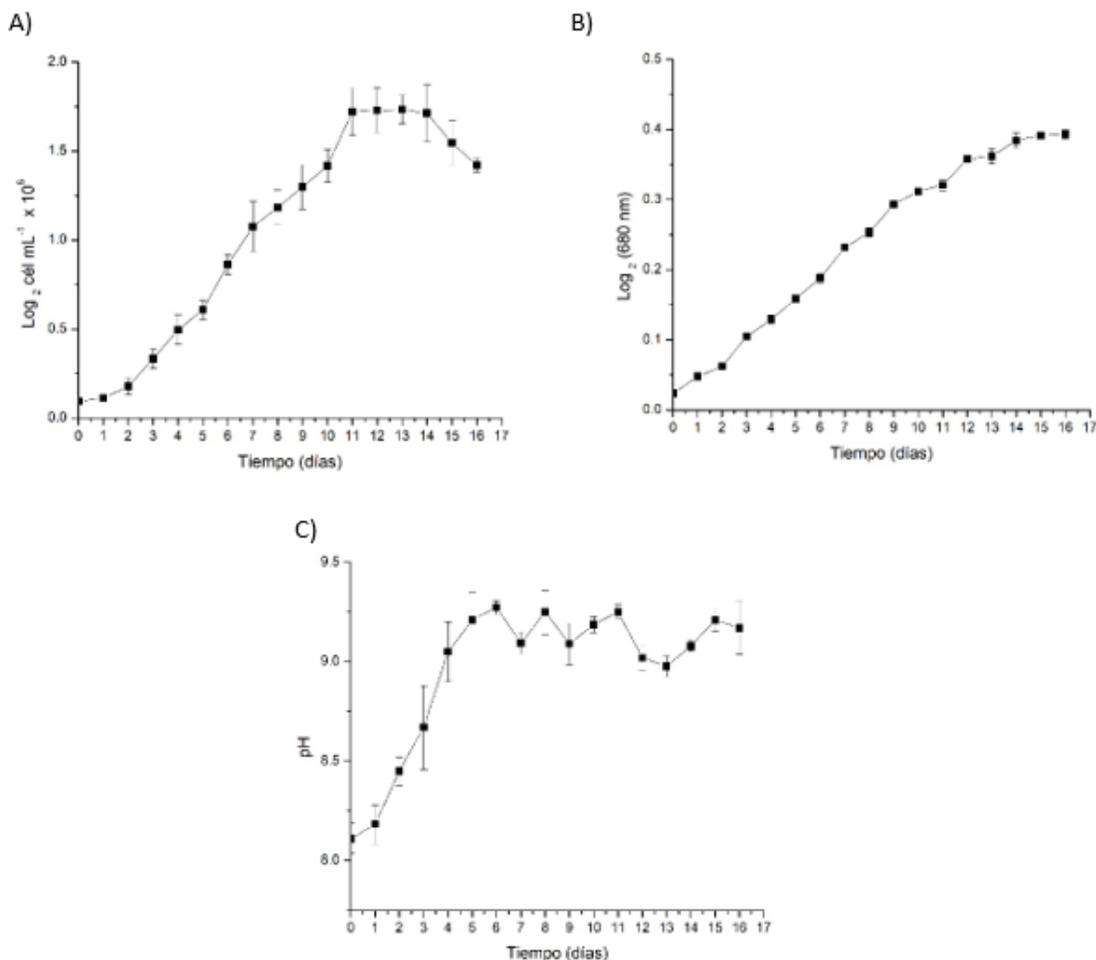


Figura 21. Caracterización del crecimiento de *Nitzschia thermalis* A) Conteos celulares; B) Densidad óptica; C) pH. Los datos muestran los valores promedio (n=3) y desviación estándar.

3.4 Inhibición del crecimiento de *Vibrio* spp. por *N. thermalis*

3.4.1 Crecimiento de *N. thermalis* en cocultivo con *Vibrio* spp.

Al igual que los cultivos de *N. subinflatooides* los cultivos de *N. thermalis* resultaron estar libres de bacterias del tipo *Vibrio* previo a los ensayos de inhibición, esto se comprobó a partir de realizar filtrados de 1 y 10 mL de los cultivos. Los ensayos de inhibición con *N. thermalis* se siguieron hasta que la diatomea alcanzó la fase estacionaria de crecimiento (día 8). La densidad celular máxima alcanzada en los cultivos de *N. thermalis* en conjunto con *V. harveyi* (0.64×10^6 cél mL⁻¹) y *V.*

campbellii (0.65×10^6 cél mL⁻¹) (Figura 22A) presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al tratamiento control (0.73×10^6 cel mL⁻¹).

Se evaluó la densidad celular de los cultivos en ausencia y presencia de *Vibrio* spp. mediante espectrofotometría a 680 nm de longitud de onda. No se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos de *N. thermalis* (Figura 22B).

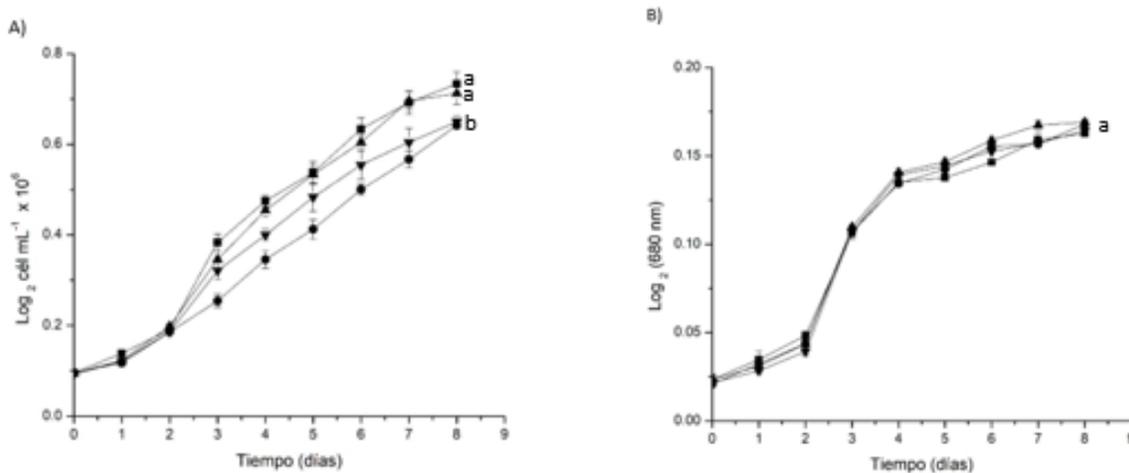


Figura 22. Curvas de crecimiento de *Nitzschia thermalis* A) conteos celulares; B) Densidad óptica. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de *N. subinflatoides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. *N. thermalis* (■), *N. thermalis* + *V. harveyi* (●), *N. thermalis* + *V. alginolyticus* (▲), *N. thermalis* + *V. campbellii* (▼).

Respecto a las tasas de crecimiento de los cultivos en ausencia o presencia de *Vibrio*, la mayor tasa de crecimiento se obtuvo en el cultivo de *N. thermalis* con *V. harveyi* (0.55 div día⁻¹), la menor tasa de crecimiento se presentó en el cultivo de *N. thermalis* en cocultivo con *V. alginolyticus* (0.41 div día⁻¹) (Tabla 4). Diferencias significativas ($p < 0.05$) se presentaron en los tres tratamientos con *Vibrio* con respecto al tratamiento control. Para los tiempos de generación, el valor mayor se presentó en *N. thermalis* para el cocultivo con *V. alginolyticus* (2.39 días), el menor tiempo de generación se presentó en el tratamiento de *N. thermalis* en cocultivo con *V. harveyi* (1.8 días). Diferencias significativas ($p < 0.05$) se encontraron en los tiempos de generación de los tratamientos con *V. alginolyticus* y *V. campbellii* en comparación con el tratamiento control (2.01 días).

En la tabla 4, se muestran los datos de las mediciones celulares de *N. thermalis* (ancho y longitud) realizadas durante la fase estacionaria (día 8), día en el que concluyó el ensayo de inhibición. Las mediciones del día 8, fueron comparadas con las mediciones al inicio del experimento (día 0) encontrando únicamente diferencias significativas ($p < 0.05$) en las mediciones celulares (ancho) en el cultivo de *N. thermalis* en conjunto con *V. alginolyticus*.

Tabla 4. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento en fase exponencial, tasa de generación y tamaño celular de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp.

Tratamiento	Tasa de crecimiento (μ : divisiones día ⁻¹)	Tiempo de generación (Tg: días)	Tamaño celular (día 8)	
			Longitud	Ancho
<i>Nitzschia thermalis</i>	0.49 ± 0.04 b	2.01 ± 0.19 b	23.00 ± 1.70 a	2.88 ± 0.47 a
<i>N. thermalis</i> + <i>Vibrio harveyi</i>	0.55 ± 0.02 a	1.80 ± 0.07 b	23.45 ± 1.46 a	2.97 ± 0.44 a
<i>N. thermalis</i> + <i>V. alginolyticus</i>	0.41 ± 0.004 c	2.39 ± 0.02 a	22.54 ± 2.00 a	2.67 ± 0.35 b
<i>N. thermalis</i> + <i>V. campbellii</i>	0.43 ± 0.02 c	2.32 ± 0.10 a	23.53 ± 1.51 a	2.75 ± 0.43 a

Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c.

3.4.2 Efecto inhibitorio de *Nitzschia thermalis* contra *Vibrio* spp.

Se presentaron niveles indetectables de *V. harveyi* por acción de *N. thermalis* a las 96 h, durante la fase exponencial de crecimiento de la diatomea. Dicho efecto de inhibición se mantuvo hasta finalizar el ensayo durante la fase estacionaria (día 8) (Figura 23). Diferencias significativas ($p < 0.05$) se presentaron en las concentraciones de *Vibrio* mL⁻¹ (días 0, 1 y 2) en comparación con los días 4, 7 y 8.

El control de *V. harveyi* cultivado en medio “F” mantuvo su densidad desde el inicio del experimento hasta el final del reto de inhibición, lo que demuestra que *V. harveyi* tiene la capacidad para crecer en este medio de cultivo.

La densidad inicial de bacterias heterotróficas fue de 1.94×10^6 UFC mL⁻¹, para el día 4, día en el que se presentó la inhibición total de *Vibrio* la densidad de bacterias heterotróficas fue de 7.13×10^6 UFC mL⁻¹, al final del experimento durante la fase estacionaria, el número de bacterias heterotróficas fue de 10.92×10^6 UFC mL⁻¹ (Figura 23).

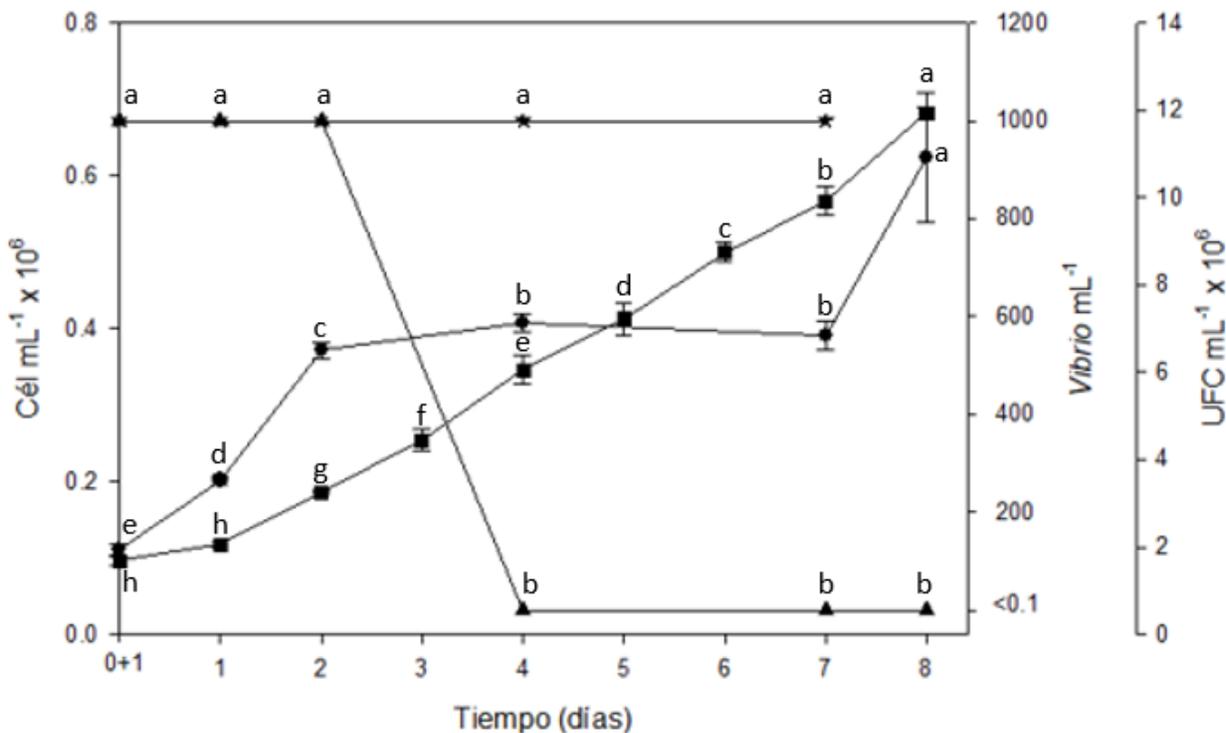


Figura 23. Reto de inhibición de *Nitzschia thermalis* contra *V. harveyi*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: *V. harveyi* (Vibrio mL^{-1} : (\blacktriangle), *V. harveyi* en tratamiento control (Vibrio mL^{-1} : (\star) y bacterias heterotróficas (UFC mL^{-1}) (\bullet) cocultivadas con *N. thermalis* (cél mL^{-1}) (\blacksquare). Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: $a>b>c>d>e>f>g>h$.

La inhibición de *V. alginolyticus* se presentó al día 2 después de inocular los cultivos de *N. thermalis* con una concentración inicial de $1 \times 10^2 \text{ Vibrio mL}^{-1}$, a este tiempo se registró una concentración promedio de $27 \text{ Vibrio mL}^{-1}$. Al igual que con *V. harveyi* el efecto inhibitorio por parte de *N. thermalis* se presentó durante la fase exponencial (Figura 24). Diferencias significativas ($p < 0.05$) se presentaron en las concentraciones iniciales en comparación con lo obtenido los días 4, 7 y 8.

El control de *V. alginolyticus* logró crecer en medio "F", la densidad inicial se mantuvo hasta el día 4, y para el día 7 se presentó una disminución en la densidad celular de *V. alginolyticus* alrededor del 80% (Figura 24).

Con respecto a las densidades de bacterias heterotróficas, al día 0 se registró una densidad de $1.66 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$, mientras que al final del ensayo de inhibición la densidad de bacterias heterotróficas fue de $3.96 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$ (Figura 24).

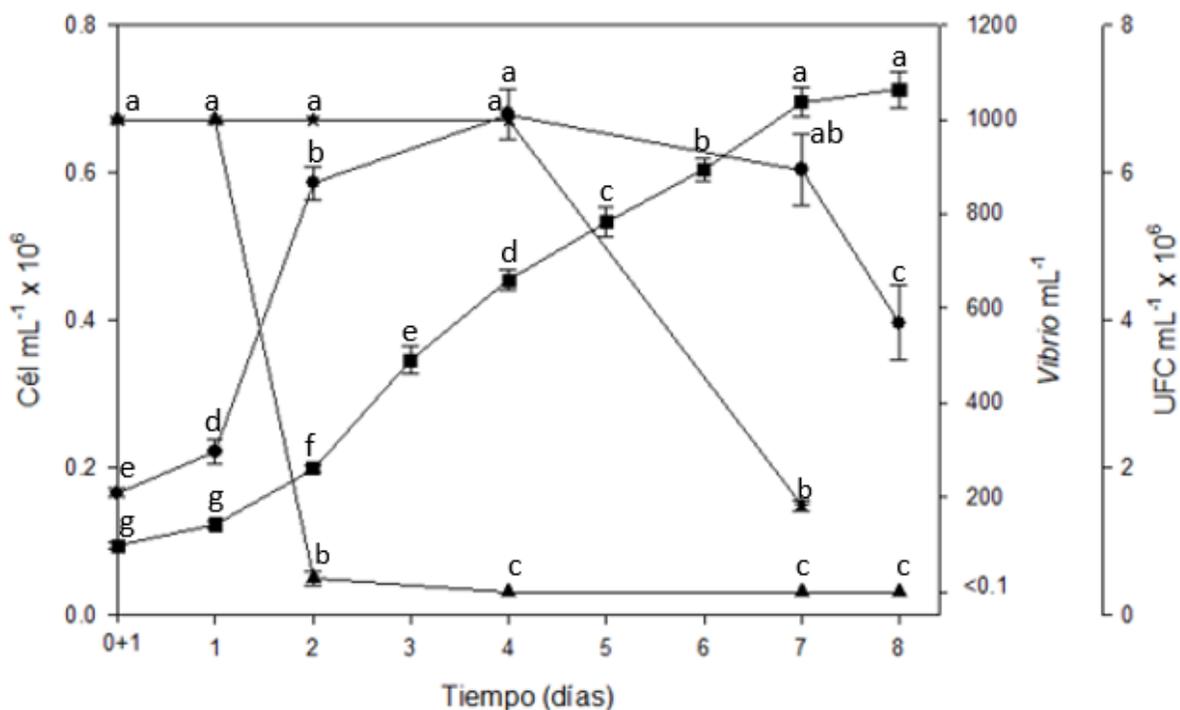


Figura 24. Reto de inhibición de *Nitzschia thermalis* contra *V. alginolyticus*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: *V. alginolyticus* (Vibrio mL⁻¹: (▲), *V. alginolyticus* en tratamiento control (Vibrio mL⁻¹: (★) y bacterias heterotróficas (UFC mL⁻¹) (●) cocultivadas con *N. thermalis* (cél mL⁻¹) (■). Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d>e>f>g.

Al igual que *V. harveyi* la inhibición total de *V. campbellii* por parte de *N. thermalis* se presentó al día 4, durante la fase exponencial del crecimiento de *N. thermalis*, este efecto inhibitorio se mantuvo hasta la fase estacionaria (día 8) (Figura 25). Diferencias significativas ($p < 0.05$) se presentaron en las concentraciones de Vibrio mL⁻¹ (días 0, 1 y 2) en comparación con los días 4, 7 y 8 de cultivo.

El control de *V. campbellii* cultivado en medio "f" mantuvo su densidad desde el inicio del experimento hasta el final del reto de inhibición, lo que demuestra que *V. campbellii* tiene la capacidad para crecer en este medio de cultivo.

La concentración inicial de bacterias heterotróficas al día 0 fue de 1.54×10^6 UFC mL⁻¹, mientras que al día 8, día en el que *N. thermalis* alcanzó la fase estacionaria la concentración de bacterias heterotróficas registrada fue de 3.76×10^6 UFC mL⁻¹ (Figura 25).

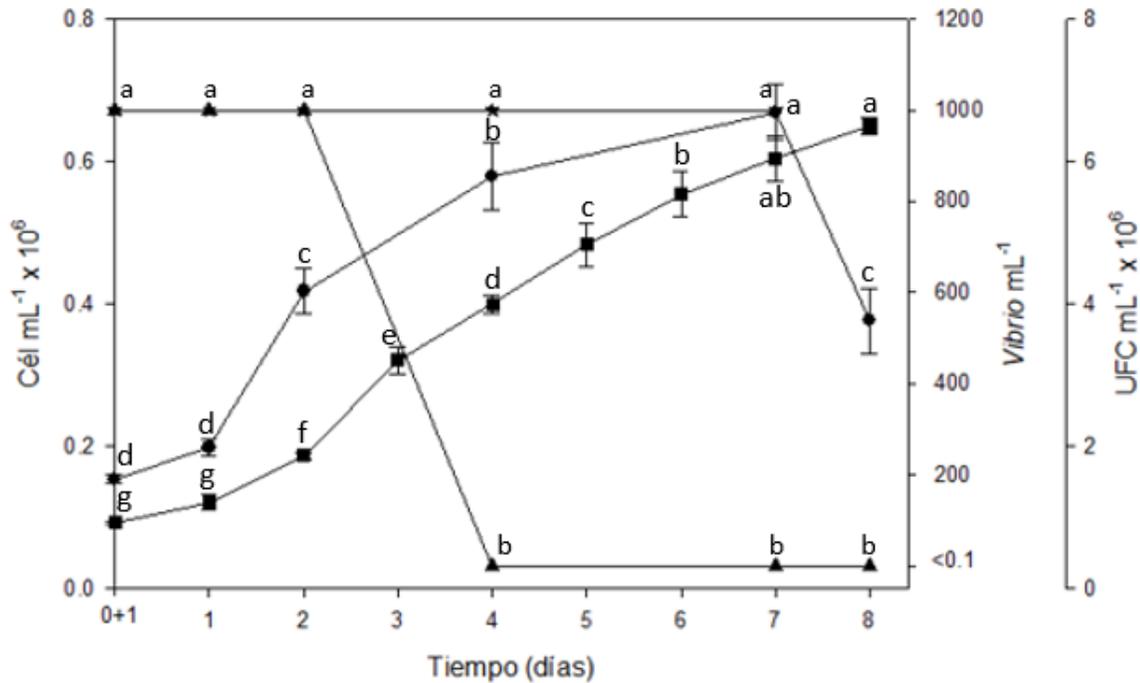


Figura 25. Reto de inhibición de *Nitzschia thermalis* contra *V. campbellii*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: *V. campbellii* (Vibrio mL⁻¹: (▲), *V. campbellii* (UFC mL⁻¹: (★) y bacterias heterotróficas (UFC mL⁻¹) (●) cocultivadas con *N. thermalis* (Cél mL⁻¹) (■). Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d>e>f>g.

Al igual que para *N. subinflatooides*, los resultados de inhibición para *Vibrio* spp. en los filtrados de 1 mL siguieron las mismas tendencias que en los filtrados de 10 mL y se muestran en la sección de anexos (Figura 47-49).

En los cocultivos de *N. thermalis* con *V. campbellii* y *V. alginolyticus* durante las primeras 48 h de los ensayos de inhibición se presentó un crecimiento de manera aglomerada (biopelícula) durante el conteo de bacterias heterotróficas en los cocultivos con ambas especies de bacterias (Figura 26), este crecimiento puede deberse a una estrategia bacteriana denominada movimiento en enjambre, la cual les permite a las bacterias exhibir una mayor resistencia contra distintos antibióticos.

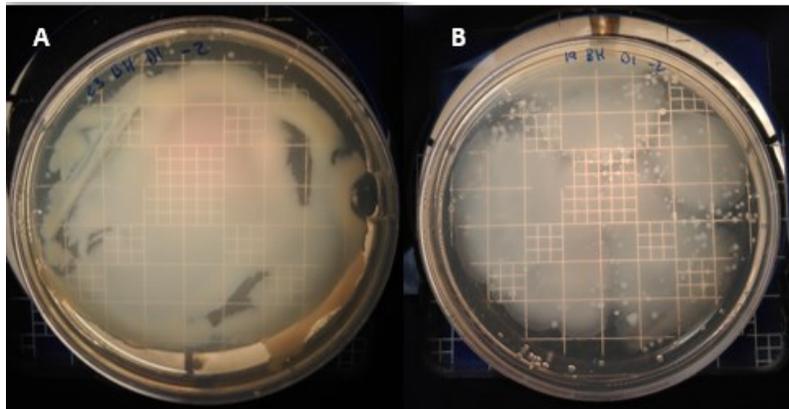


Figura 26. Cultivo de bacterias heterotróficas. A) bacterias provenientes del cocultivo con *Vibrio campbellii*; B) bacterias provenientes del cocultivo con *V. alginolyticus*. Muestras tomadas a las 24 h de los ensayos de inhibición.

3.4.3 Peso seco total, contenido de cenizas y peso seco orgánico de *N. thermalis*

El peso seco total no presentó diferencias significativas durante las fases exponencial y estacionaria con la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*) ($p > 0.05$). El peso seco total no evidenció diferencias significativas entre las fases de crecimiento ($p > 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se encontró una interacción significativa ($p < 0.05$) en el peso seco total por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento. El mayor peso seco total en la fase exponencial se obtuvo en el cultivo inoculado con *V. alginolyticus* ($2576.29 \text{ pg cél}^{-1}$), mientras que para la fase estacionaria el mayor contenido de peso seco total se presentó para el cultivo inoculado con *V. campbellii* ($711.34 \text{ pg cél}^{-1}$) (Figura 27).

Para el contenido de cenizas no se encontraron diferencias significativas en ambas fases de crecimiento ($p > 0.05$) por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*). El contenido de cenizas presentó diferencias significativas entre las fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se encontró una interacción significativa ($p < 0.05$) en el contenido de cenizas por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento. El mayor contenido de cenizas fue de $1879.63 \text{ pg cél}^{-1}$ correspondiente a *N. thermalis* cocultivado con *V. alginolyticus*, para la fase estacionaria, el mayor contenido de cenizas se presentó en el tratamiento cocultivado con *V. campbellii* ($464.39 \text{ pg cél}^{-1}$) (Figura 28).

Para el peso seco orgánico no se presentaron diferencias significativas durante las fases exponencial y estacionaria con la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*) ($p > 0.05$). El peso seco orgánico mostró diferencias entre ambas fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos. No existió una interacción significativa ($p > 0.05$) por efecto del peso seco orgánico en los distintos tratamientos y las fases de crecimiento. El cultivo con *V. alginolyticus* presentó el mayor contenido de peso seco orgánico total durante la fase exponencial (696.65 pg cél^{-1}), por su parte, el tratamiento inoculado con *V. campbellii* presentó el mayor contenido de peso seco orgánico durante la fase estacionaria (246.95 pg cél^{-1}) (Figura 29).

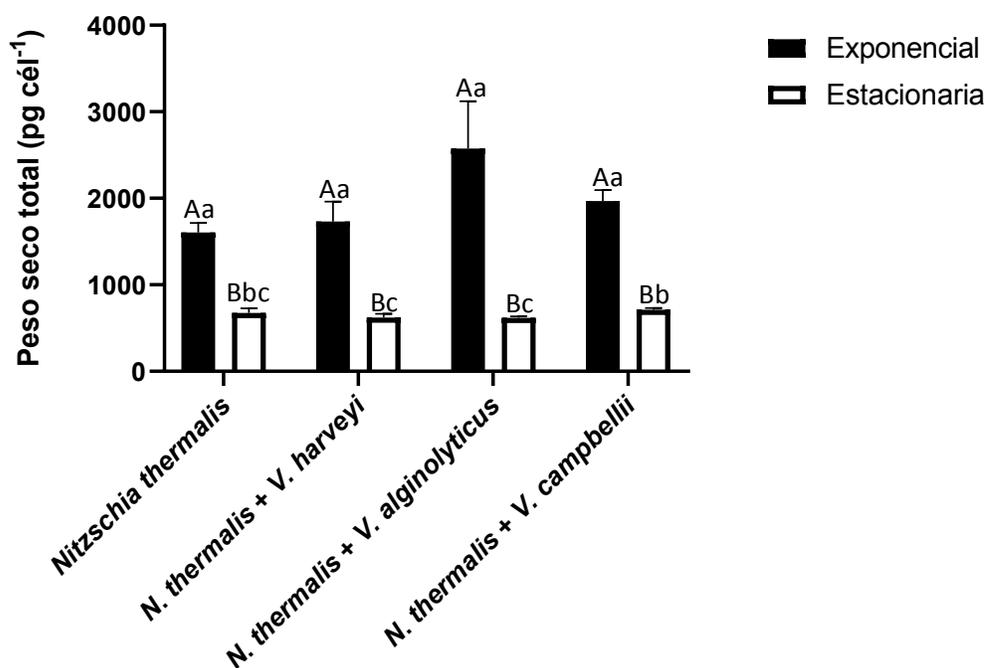


Figura 27. Valores promedio y desviación estándar del peso seco de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B.

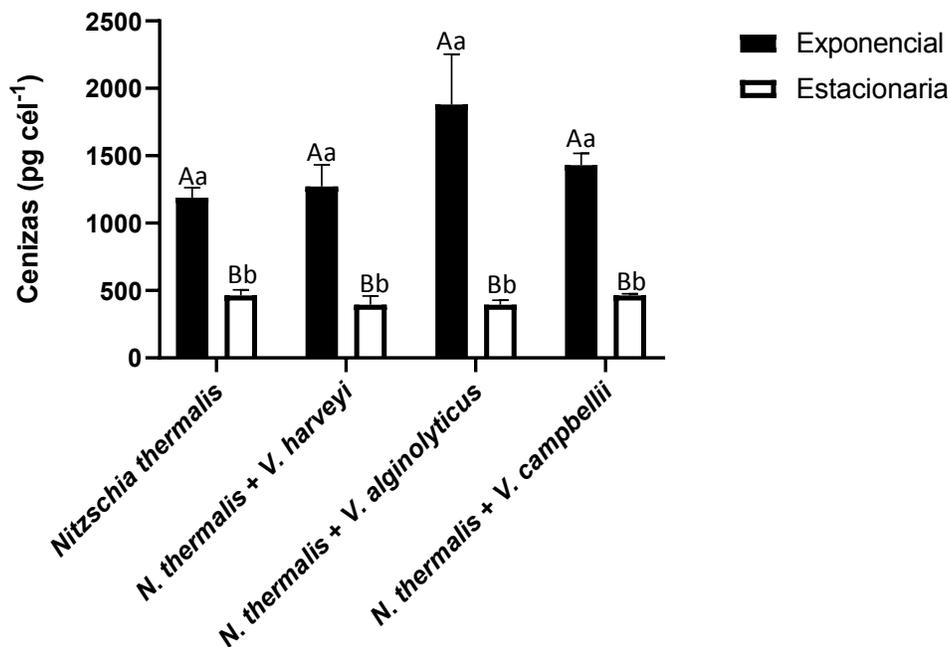


Figura 28. Valores promedio y desviación estándar del contenido de cenizas de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B.

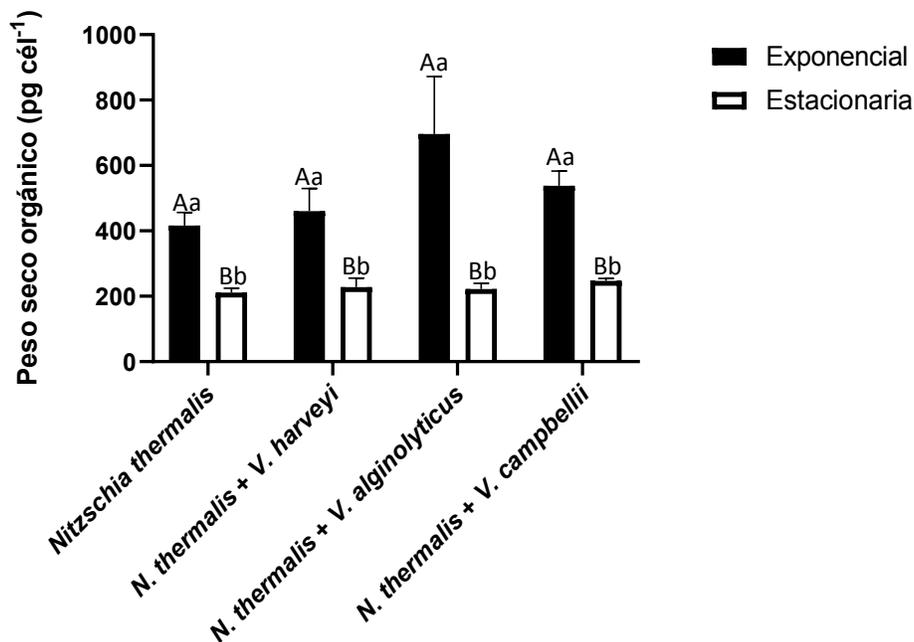


Figura 29. Valores promedio y desviación estándar del peso seco orgánico de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B.

3.4.4 Composición proximal de *N. thermalis*

El contenido de carbohidratos no presentó diferencias significativas durante la fase exponencial de crecimiento ($p > 0.05$) por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*). Para la fase estacionaria se mostraron diferencias significativas por la adición de *V. campbellii* ($p < 0.05$). El contenido de carbohidratos evidenció diferencias significativas entre las fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se encontró una interacción significativa ($p < 0.05$) en el contenido de carbohidratos por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento. El mayor contenido de carbohidratos en la fase exponencial se presentó en el tratamiento control (22.94 $\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$), mientras que para la fase estacionaria el mayor contenido de carbohidratos se presentó en el cocultivo con *V. campbellii* (20.38 $\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$) (Figura 30).

Para el contenido de lípidos se encontraron diferencias significativas durante la fase exponencial por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*) ($p < 0.05$). En cuanto a la fase estacionaria, el contenido de lípidos mostró diferencias significativas con la adición de *V. harveyi* y *V. campbellii* ($p < 0.05$). El contenido de lípidos presentó diferencias significativas entre las fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se evaluó una interacción significativa ($p < 0.05$) en el contenido de lípidos por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento. El mayor contenido de lípidos tanto en fase exponencial (1232.76 $\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$) como estacionaria (441.96 $\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$), se presentó en el cocultivo con *V. campbellii* (Figura 31).

El contenido de proteínas mostró diferencias significativas en la fase exponencial por la adición de *V. harveyi* ($p < 0.05$). Durante la fase exponencial no se presentaron diferencias significativas en el contenido de proteínas ($p > 0.05$) por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*). El contenido de proteínas presentó diferencias significativas entre las fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se presentó una interacción significativa en el contenido de proteínas ($p < 0.05$) por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento. El mayor contenido de proteínas en la fase exponencial se presentó en el cocultivo con *V. harveyi* (502.97 $\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$), para la fase estacionaria el mayor contenido de proteínas se presentó en el cocultivo con *V. campbellii* (337.43 $\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$) (Figura 32).

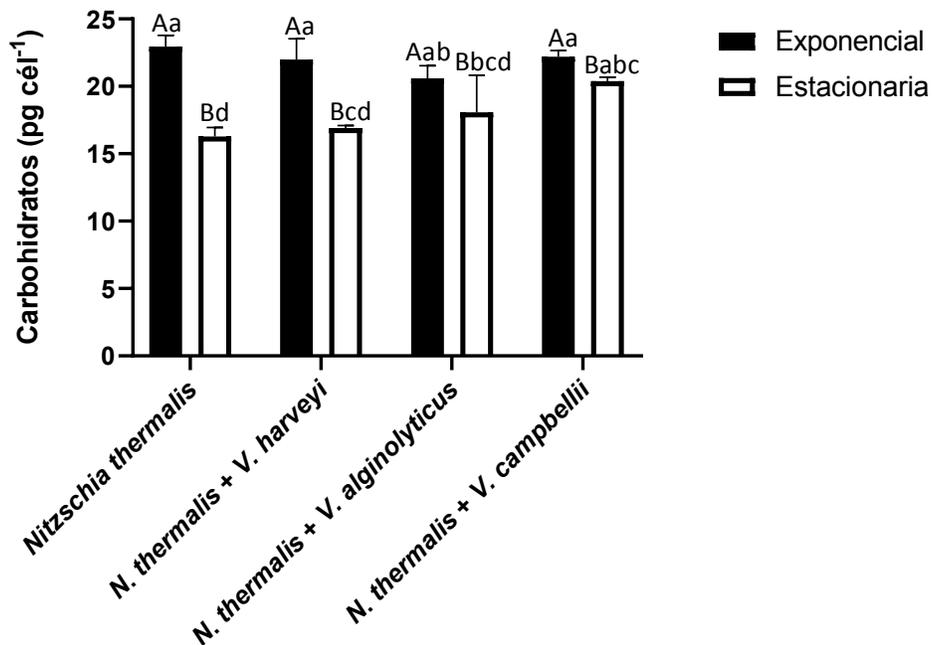


Figura 30. Valores promedio y desviación estándar del contenido de carbohidratos de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B.

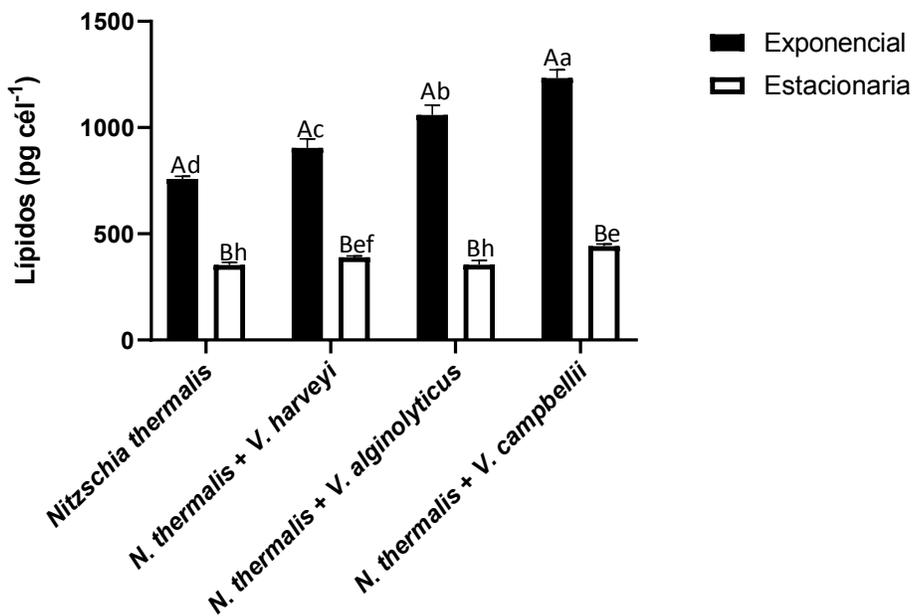


Figura 31. Valores promedio y desviación estándar del contenido de lípidos de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d>e>f>g>h. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B.

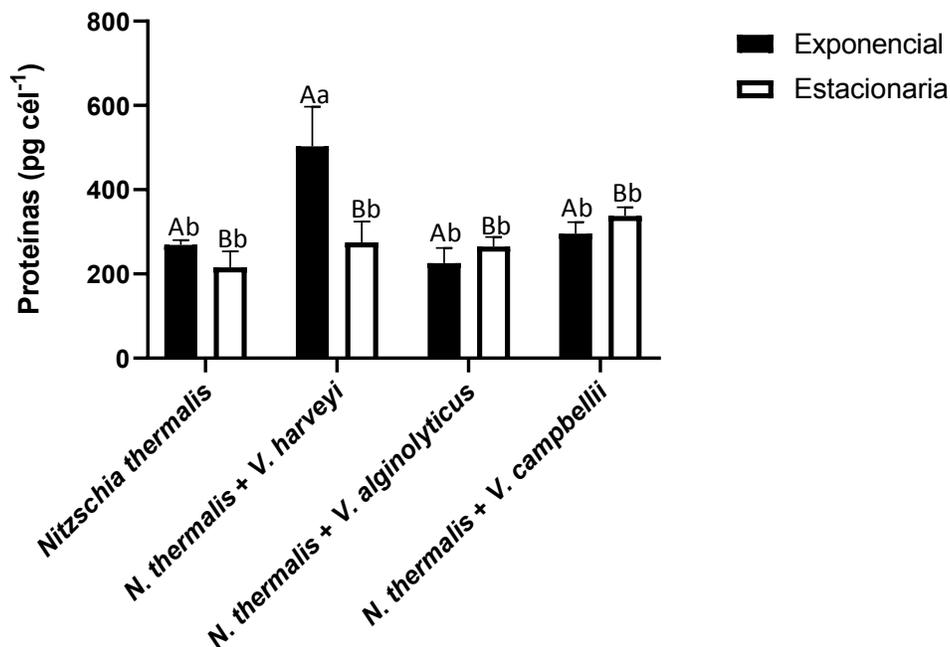


Figura 32. Valores promedio y desviación estándar del contenido de proteínas de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B.

3.4.5 Cuantificación de pigmentos de *N. thermalis*

Para la Chl-a no se presentaron diferencias significativas durante la fase exponencial por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*) ($p > 0.05$). Durante la fase estacionaria se obtuvieron diferencias significativas para la Chl-a por la adición *V. campbellii* ($p < 0.05$). El contenido de Chl-a mostró diferencias significativas entre las fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos. No se presentó una interacción significativa ($p > 0.05$) en el contenido de Chl-a por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento. El mayor contenido de Chl-a tanto en fase exponencial (0.17 pg cél⁻¹) como en fase estacionaria (0.01 pg cél⁻¹) se presentó en el tratamiento en cocultivo con *V. harveyi* (Figura 33).

El contenido de Chl-c presentó diferencias significativas durante la fase exponencial por la adición de *V. alginolyticus* y *V. campbellii* ($p < 0.05$), mientras que para *V. harveyi* no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$). Para la fase estacionaria no se obtuvieron diferencias significativas para el

contenido de Chl-c por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*) ($p > 0.05$). El contenido de Chl-c mostró diferencias significativas entre las fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se presentó una interacción significativa en el contenido de Chl-c por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento ($p < 0.05$). El mayor contenido de Chl-c durante la fase exponencial se presentó en los tratamientos adicionados con *V. alginolyticus* y *V. campbellii* ($0.070 \text{ pg cél}^{-1}$), mientras que en la fase estacionaria el mayor contenido de Chl-c se presentó en el cocultivo con *V. harveyi* (0.41 pg cél^{-1}) (Figura 34).

El contenido de car mostró diferencias significativas durante la fase exponencial por la adición de *V. alginolyticus* ($p > 0.05$), mientras que no se presentaron diferencias significativas por la adición de *V. alginolyticus* y *V. campbellii* ($p > 0.05$). Para la fase estacionaria se obtuvieron diferencias significativas por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*) ($p < 0.05$). El contenido de car presentó diferencias significativas entre las fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se encontró una interacción significativa ($p < 0.05$) en el contenido de car en los distintos tratamientos y las fases de crecimiento. El mayor contenido de car durante la fase exponencial se presentó en el tratamiento control ($0.052 \text{ pg cél}^{-1}$), para la fase estacionaria el mayor contenido se encontró el cocultivo con *V. campbellii* ($0.056 \text{ pg cél}^{-1}$) (Figura 35).

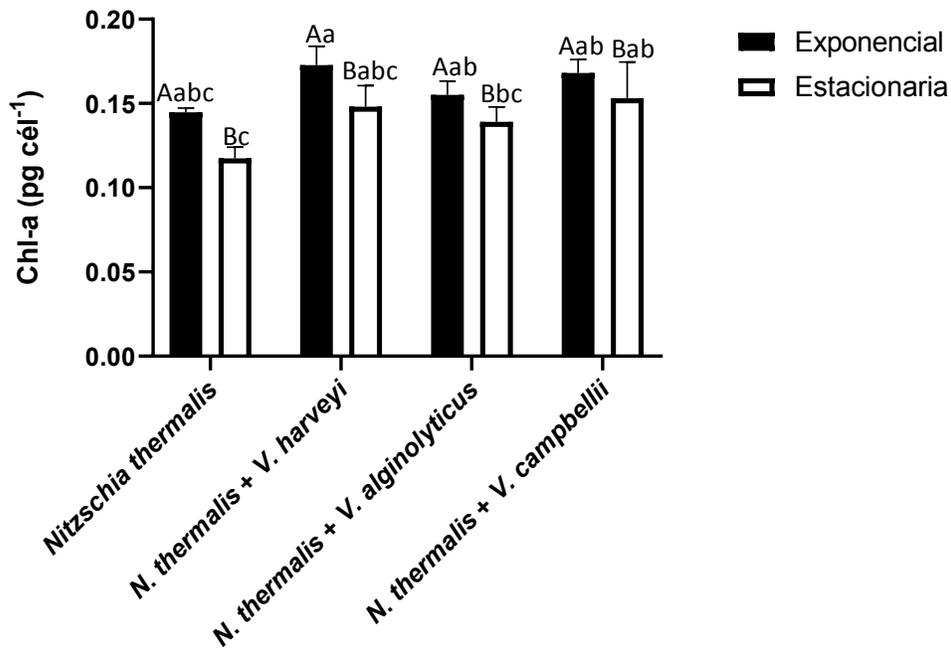


Figura 33. Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila a (Chl-a) de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B.

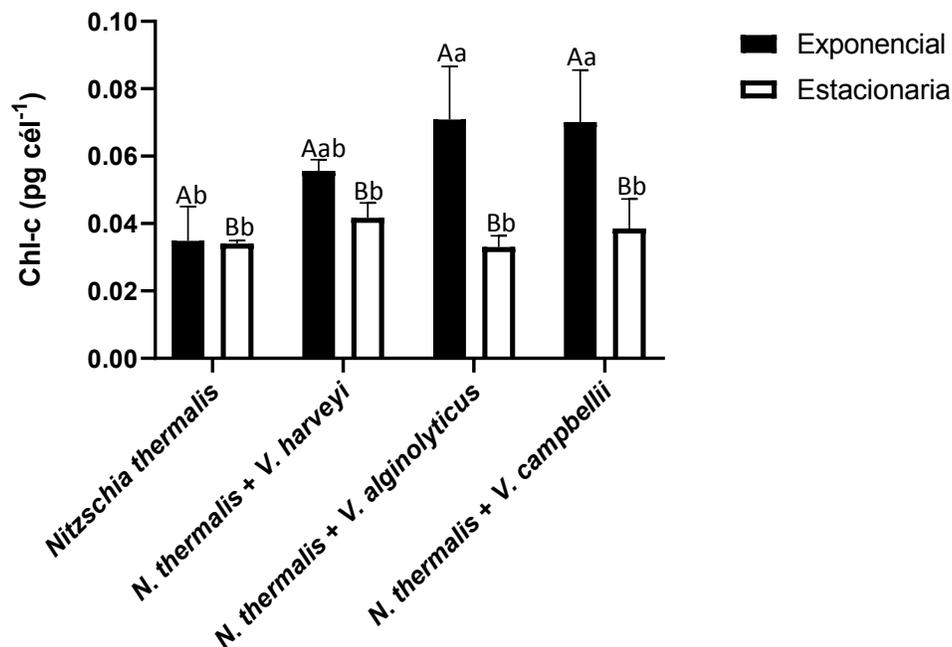


Figura 34. Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila c (Chl-c) de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B.

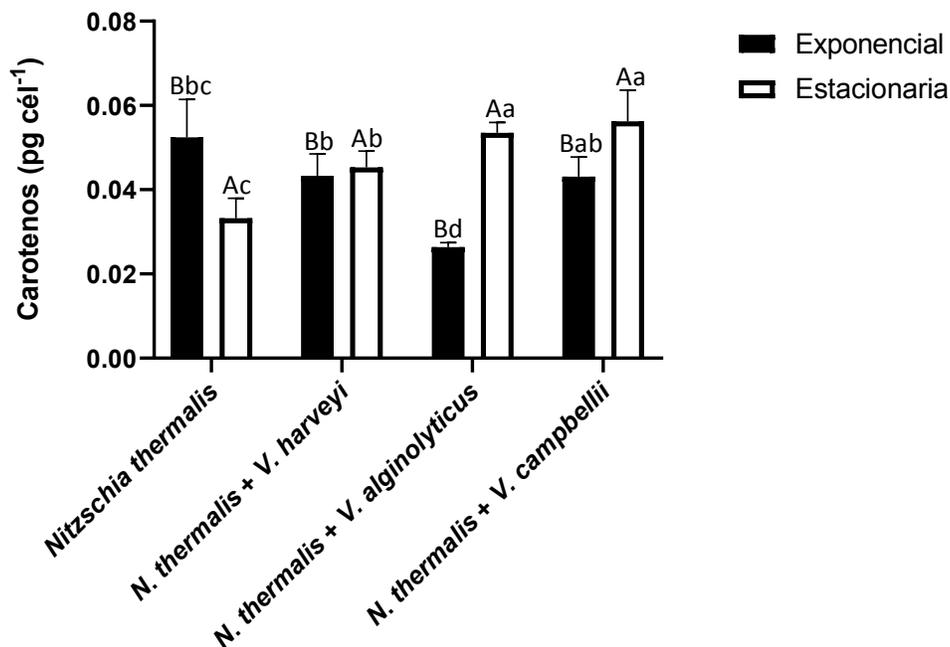


Figura 35. Valores promedio y desviación estándar del contenido de carotenos (car) de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b.>c>d. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B.

3.4.6 Parámetros fotosintéticos de *N. thermalis*

Para la pendiente inicial (α) no se presentaron diferencias significativas durante la fase exponencial por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*) ($p > 0.05$). Para la fase estacionaria se encontraron diferencias significativas para α por la adición de *V. alginolyticus* ($p < 0.05$). No se mostraron diferencias significativas en el valor de α entre las fases de crecimiento ($p > 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se presentó una interacción significativa en α por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento ($p < 0.05$). El mayor valor para α en la fase exponencial se presentó en el cocultivo con *V. campbellii* (0.117), mientras que en la fase estacionaria el tratamiento control (*N. thermalis*) presentó el mayor valor de α (0.152) (Figura 36).

La tasa de transporte de electrones (ETR_{max}) mostró diferencias significativas durante las fases exponencial y estacionaria por la adición de *V. campbellii* ($p < 0.05$). No se presentaron diferencias significativas para ETR_{max} entre las fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos.

Se encontró una interacción significativa en ETR_{max} por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento ($p < 0.05$). El mayor valor de ETR_{max} en la fase exponencial se presentó en el cocultivo con *V. alginolyticus* (125.84), para la fase estacionaria el mayor valor de ETR_{max} fue de 76.72 correspondiente al tratamiento control (Figura 37).

La irradiancia de saturación (E_k) presentó diferencias significativas durante la fase exponencial por la adición de *V. campbellii* ($p < 0.05$). En la fase estacionaria se mostraron diferencias significativas para E_k por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*) ($p < 0.05$). Se encontraron diferencias significativas para E_k entre las fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se encontró una interacción significativa en E_k por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento ($p < 0.05$). El mayor valor para E_k en la fase exponencial se presentó en el cocultivo con *V. campbellii* (810.22), durante la fase estacionaria el mayor valor para E_k se obtuvo en el cocultivo con *V. alginolyticus* (834.01) (Figura 38).

Para la eficiencia cuántica (F_v/F_m) no se presentaron diferencias significativas durante ambas fases de crecimiento por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*) ($p > 0.05$). No se presentaron diferencias significativas para F_v/F_m entre las fases de crecimiento ($p < 0.05$) por efecto de los tratamientos. Para F_v/F_m no existió una interacción significativa por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento ($p > 0.05$). El mayor valor para F_v/F_m en la fase exponencial se presentó para el cocultivo con *V. alginolyticus* (0.67), para la fase estacionaria el mayor valor de F_v/F_m fue de 0.61 correspondiente al tratamiento control (Figura 39).

En la figura 40 se muestran las curvas de fotosíntesis-irradiancia (ETR) correspondientes a los cocultivos de *N. thermalis* tanto en fase exponencial como en fase estacionaria. Se presentaron diferencias significativas por la adición de *V. alginolyticus* y *V. campbellii* durante la fase exponencial ($p < 0.05$), mientras que, para la fase estacionaria no se presentaron diferencias significativas por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*) ($p < 0.05$). Se mostraron diferencias significativas para ETR entre fases de crecimiento ($p > 0.05$) por efecto de los tratamientos. Se evaluó una interacción significativa en ETR por efecto de los distintos tratamientos y las fases de crecimiento ($p < 0.05$). Los resultados muestran que el cocultivo de *N. thermalis* con *V. campbellii* presenta la mayor eficiencia fotosintética durante la fase exponencial de crecimiento

de *N. inflatoides*, en tanto que, para la fase estacionaria de crecimiento de la diatomea la mejor eficiencia fotosintética se presentó en el tratamiento control (*N. thermalis*).

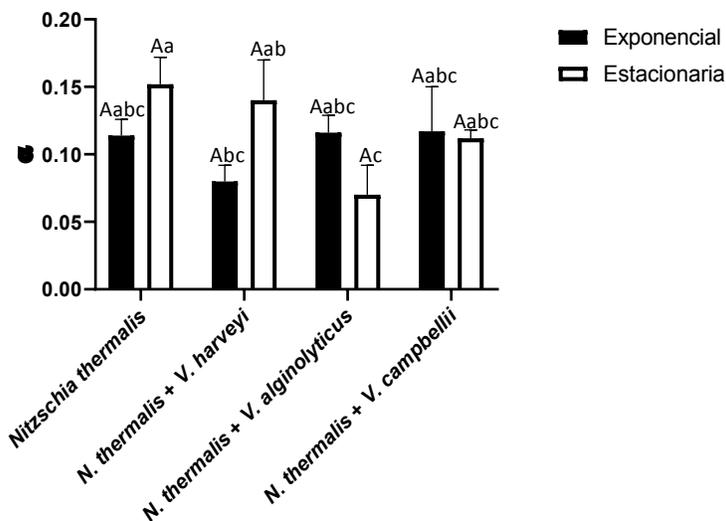


Figura 36. Valores promedio y desviación estándar de la pendiente inicial de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B.

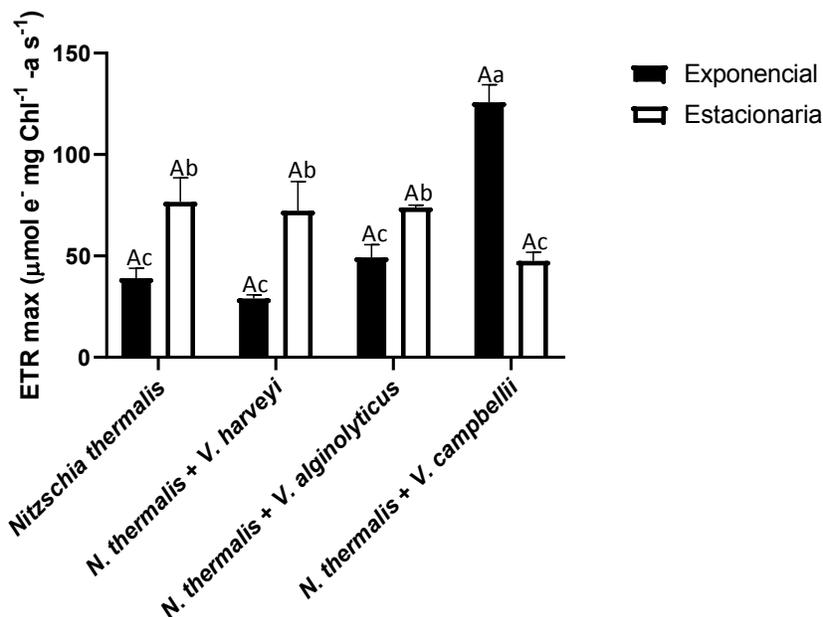


Figura 37. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de transporte de electrones de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: A>B.

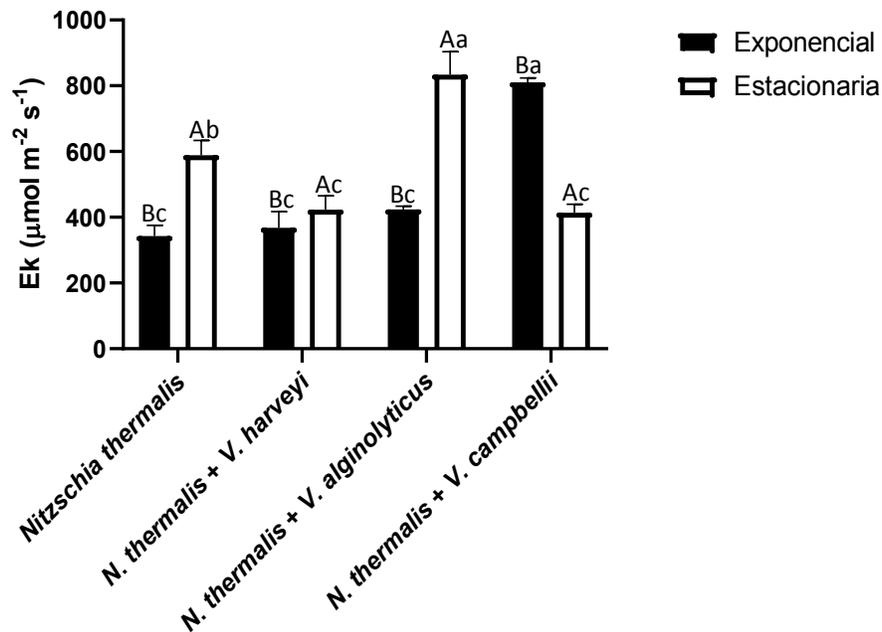


Figura 38. Valores promedio y desviación estándar de la irradiancia de saturación de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: $a>b>c$. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: $A>B$.

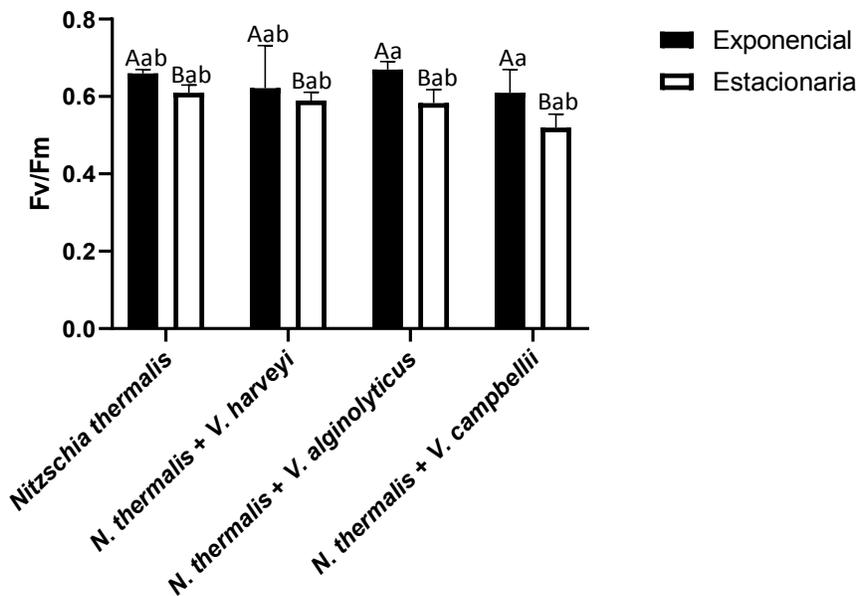


Figura 39. Valores promedio y desviación estándar de la eficiencia cuántica de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria del crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: $a>b$. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: $A>B$.

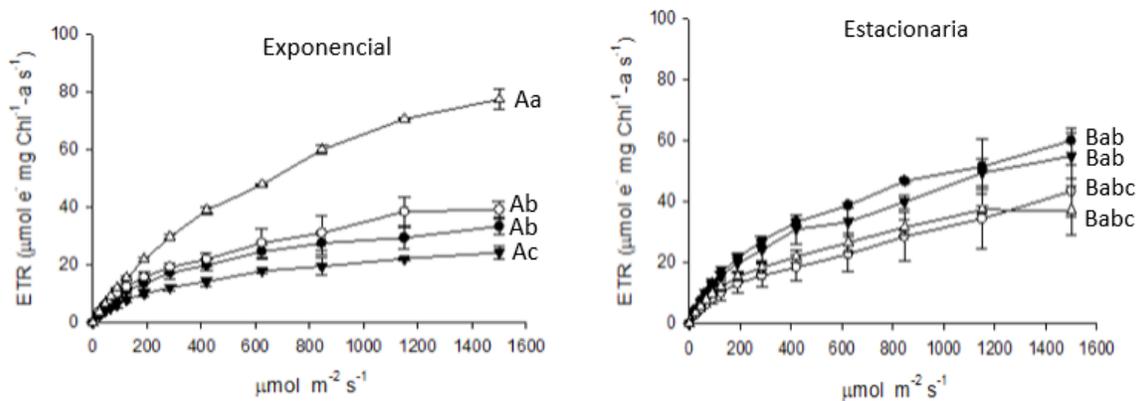


Figura 40. Curvas fotosintéticas medidas como tasa máxima de transporte de electrones de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase exponencial y estacionaria de crecimiento. Análisis de varianza de dos vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: $a>b>c$. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases de crecimiento: $A>B$. *N. thermalis* (●), *N. thermalis* + *V. harveyi* (▼), *N. thermalis* + *V. alginolyticus* (○), *N. thermalis* + *V. campbellii* (△).

3.4.7 Composición de ácidos grasos de *N. thermalis*

La composición de ácidos grasos de *N. thermalis* (tratamiento control y cocultivos con *Vibrio* spp.) se muestran en la tabla 5. En la mayoría de los ácidos grasos se presentaron diferencias significativas por la adición de *Vibrio* spp. Para todos los casos se presentó un aumento en el contenido de ácidos grasos saturados (SFA) y poliinsaturados (PUFAs) y una disminución en el contenido de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) por la adición de las tres especies de *Vibrio* spp. (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*) (Figura 50).

Tabla 5. Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de ácidos grasos de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp. en fase estacionaria de crecimiento.

Composición de ácidos grasos	<i>Nitzschia thermalis</i>	<i>N. thermalis</i> + <i>V. harveyi</i>	<i>N. thermalis</i> + <i>V. alginolyticus</i>	<i>N. thermalis</i> + <i>V. campbellii</i>
SFA				
C4:0	0.17 ± 0.02 a	0.15 ± 0.02 a	0.06 ± 0.01 b	0.08 ± 0.00 b
C6:0	0.15 ± 0.03 ab	0.16 ± 0.02 ab	0.13 ± 0.01 b	0.18 ± 0.01 a
C8:0	0.04 ± 0.00 c	0.04 ± 0.01 c	0.11 ± 0.01 b	0.15 ± 0.01 a
C10:0	4.00 ± 0.10 c	4.51 ± 0.55 c	8.41 ± 0.69 b	12.52 ± 1.65 a
C11:0	0.01 ± 0.00 c	0.02 ± 0.00 b	0.02 ± 0.00 bc	0.06 ± 0.00 a
C12:0	1.53 ± 0.09 a	0.03 ± 0.00 b	0.03 ± 0.00 b	0.07 ± 0.00 b
C13:0	6.73 ± 0.59 c	5.78 ± 0.45 c	13.74 ± 0.44 a	8.70 ± 0.36 b
C14:0	4.42 ± 0.38 a	3.38 ± 0.07 b	2.81 ± 0.27 b	2.78 ± 0.08 b
C15:0	0.34 ± 0.03 c	0.57 ± 0.04 a	0.43 ± 0.03 b	0.51 ± 0.03 a
C16:0	13.10 ± 0.20 ab	14.47 ± 1.28 a	12.95 ± 0.90 b	12.17 ± 0.37 b
C17:0	7.31 ± 0.21 a	6.97 ± 0.21 a	5.43 ± 0.11 b	5.20 ± 0.20 b
C18:0	0.99 ± 0.06 a	0.73 ± 0.06 bc	0.61 ± 0.03 c	0.86 ± 0.06 ab
C20:0	0.04 ± 0.00 d	0.39 ± 0.02 b	0.17 ± 0.02 c	0.48 ± 0.04 a
C21:0	2.11 ± 0.22 c	4.78 ± 0.19 a	3.36 ± 0.36 b	3.32 ± 0.15 b
C22:0	0.19 ± 0.03 c	0.41 ± 0.02 a	0.31 ± 0.01 b	0.43 ± 0.01 a
C23:0	0.18 ± 0.03 c	0.53 ± 0.04 a	0.34 ± 0.03 b	0.39 ± 0.08 b
C24:0	0.71 ± 0.07 b	1.38 ± 0.09 a	1.25 ± 0.09 a	0.75 ± 0.06 b
MUFA				
C14:1	11.58 ± 0.76 a	0.24 ± 0.03 b	0.05 ± 0.01 b	0.10 ± 0.00 b
C15:1	0.10 ± 0.01 b	0.08 ± 0.01 b	0.05 ± 0.00 c	0.14 ± 0.02 a
C16:1	25.44 ± 0.95 a	21.71 ± 0.18 b	22.67 ± 0.50 b	22.52 ± 1.11 b
C17:1	0.07 ± 0.01 b	0.08 ± 0.01 b	0.07 ± 0.01 b	0.50 ± 0.04 a
C18:1n9 C	1.31 ± 0.18 b	1.96 ± 0.18 a	1.75 ± 0.25 ab	2.23 ± 0.12 a
C18:1n9 T	3.70 ± 0.08 a	2.11 ± 0.13 b	1.79 ± 0.08 c	2.15 ± 0.14 b
C20:1n9	0.14 ± 0.00 b	0.33 ± 0.03 a	0.11 ± 0.01 b	0.31 ± 0.02 a
C22:1n9	ND	0.25 ± 0.02 a	0.04 ± 0.00 c	0.10 ± 0.00 b
C24:1n9	0.34 ± 0.03 b	0.75 ± 0.12 a	0.58 ± 0.07 a	0.59 ± 0.03 a
PUFA				
C18:2n6 C	0.40 ± 0.01 c	0.72 ± 0.02 b	0.66 ± 0.06 b	1.91 ± 0.09 a
C18:2n6 T	0.63 ± 0.01 a	0.62 ± 0.05 a	0.40 ± 0.01 b	0.57 ± 0.03 a
C18:3n3	0.90 ± 0.01 c	1.54 ± 0.07 a	1.19 ± 0.06 b	1.22 ± 0.08 b
C18:3n6	0.39 ± 0.03 b	0.82 ± 0.06 a	0.74 ± 0.03 a	0.77 ± 0.05 a
C20:2	0.02 ± 0.00 c	0.14 ± 0.01 a	0.07 ± 0.00 b	0.15 ± 0.00 a
C22:2	ND	0.21 ± 0.03 a	0.12 ± 0.01 b	0.13 ± 0.01 b
C20:3n3	0.06 ± 0.00 b	0.15 ± 0.02 a	0.05 ± 0.00 b	0.07 ± 0.00 b
C20:3n6	0.11 ± 0.00 c	0.24 ± 0.02 a	0.19 ± 0.01 b	0.18 ± 0.02 b
C20:4n6	1.74 ± 0.18 c	3.94 ± 0.16 a	2.77 ± 0.30 b	2.74 ± 0.12 b
C20:5n3	10.10 ± 1.13 c	16.81 ± 1.43 a	14.28 ± 0.99 ab	12.95 ± 0.55 b
C22:6n3	0.99 ± 0.07 c	3.00 ± 0.16 a	2.27 ± 0.15 b	2.02 ± 0.06 b
Total				
ΣSFA	42.12	44.30	50.16	48.65
ΣMUFA	42.48	27.51	27.11	28.64
ΣPUFA	15.40	28.19	22.74	22.71

Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c>d. T: trans; C: cis; SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados, ND: no detectado.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Crecimiento

La tasa de crecimiento de *N. subinflatooides* fue de $0.34 \text{ div día}^{-1}$, tasa menor a la obtenida por Jiménez-Valera (2016) para la misma cepa ($0.50 \text{ div día}^{-1}$), cultivada en medio “f” y a una irradiancia de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, pero a una temperatura de $20 \pm 1 \text{ °C}$, la diferencia en las tasas de crecimiento puede atribuirse a la temperatura, ya que la temperatura óptima para las diatomeas oscila entre los 15 y 20 °C , por lo que temperaturas por encima de este rango pueden afectar de manera negativa el crecimiento de las diatomeas (Sarhou *et al.*, 2005).

En el 2010, Araya *et al.* (2010) evaluaron el crecimiento de cuatro especies de diatomeas entre la que se encuentra *N. cryptocephala*, el medio de cultivo utilizado fue el medio “f/2” y se utilizaron tres distintas irradiancias (10 , 50 y $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) donde se obtuvieron tasas de crecimiento de 0.67 , 0.69 y $0.29 \text{ div día}^{-1}$, respectivamente. Esta última tasa de crecimiento es muy similar a la obtenida en este estudio ($0.34 \text{ div día}^{-1}$) y en ambos casos la irradiancia empleada fue de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Como se puede observar en el estudio de Araya *et al.* (2010), a menores irradiancias se presentan tasas de crecimiento mayores, lo cual puede deberse a que al ser diatomeas bentónicas normalmente en el ambiente no reciben tanta luz (Okolodkov y Huerta-Quintanilla, 2018), por lo que la exposición a irradiancias elevadas ($>150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) puede ocasionar estrés en las diatomeas y de esta manera la tasa de crecimiento puede verse afectada de manera negativa. Thorel *et al.* (2014) evaluaron el efecto de la irradiancia en el crecimiento de la diatomea *Pseudo-nitzschia australis* al ser cultivada en ocho distintas irradiancias (35 a $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en medio “k/2”. La mayor tasa de crecimiento se presentó a una irradiancia de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($0.83 \text{ div día}^{-1}$), mientras que, para las irradiancias de 150 , 200 y $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ el crecimiento de *Pseudo-nitzschia australis* se vio afectado de manera negativa (0.77 , 0.74 , $0.66 \text{ div día}^{-1}$, respectivamente).

La tasa de crecimiento de *N. thermalis* obtenida en este estudio fue de $0.35 \text{ div día}^{-1}$, Jiménez-Valera (2016) empleó la misma cepa y obtuvo una tasa de crecimiento de $1.02 \text{ div día}^{-1}$ al tener los cultivos en medio “f”, pero a una temperatura de 20 °C . Ramírez *et al.* (2015) obtuvieron una tasa de crecimiento de $0.97 \pm 0.32 \text{ div día}^{-1}$ para la diatomea *Nitzschia* sp. al ser cultivada en medio “f/2” y a una temperatura de 20 °C . De forma similar a lo descrito para *N. subinflatooides*, la diferencia en las tasas de crecimiento puede ser por efecto de la temperatura, la cual puede afectar el crecimiento

de manera negativa si las diatomeas son cultivadas por encima o por debajo de su temperatura óptima del grupo mesofílico (15-20 °C) (Sarhou *et al.*, 2005).

Los valores de pH oscilaron en 8.31-9.66 para *N. subinflatooides* y 8.11-9.25 para *N. thermalis* durante la caracterización del crecimiento, dichos valores se encuentran dentro del rango óptimo (6.3-10.0) para el crecimiento de diatomeas según lo reportado por Scholz (2014).

4.2 Efecto inhibitorio

Se encontró que *N. subinflatooides* inhibió el crecimiento de las tres especies de *Vibrio* evaluadas (*Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*) a niveles indetectables a los días 4, 2 y 7, respectivamente para cada especie. Molina-Cárdenas (2011), mediante cultivo en agua verde evaluó la actividad antimicrobiana de *N. incerta* contra *V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii* en donde se obtuvieron niveles de bacterias indetectables a los días 7, 4 y 4 respectivamente para cada especie. El efecto inhibitorio del crecimiento mostrado en el presente estudio fue más rápido contra las especies *V. harveyi* y *V. alginolyticus*, lo cual puede deberse a que *N. inflatooides* produzca metabolitos con actividad antimicrobiana y con mecanismos de acción distintos a los producidos por *N. incerta*. Okunowo *et al.* (2018) evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos con metanol de *Spirogyra setiformis* y *Navicula* spp. contra seis especies de bacterias de importancia clínica (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Klebsiellia pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*). Los extractos de *S. setiformis* inhibieron el crecimiento de todas las especies de bacterias a excepción de *S. typhi*. Por su parte, los extractos provenientes de *N. subinflatooides* lograron inhibir el crecimiento de todas las especies de bacterias evaluadas, lo que podría convertir a las especies del género *Navicula* en una alternativa prometedora para sustituir el uso de antibióticos contra bacterias de importancia tanto clínica como en acuicultura.

La diatomea *N. thermalis* presentó efecto inhibitorio contra *V. harveyi*, *V. campbellii* y *V. alginolyticus*, para todos los casos se presentaron niveles indetectables al día 4. Molina-Cárdenas y Sánchez-Saavedra (2017) evaluaron mediante cultivo con agua verde la actividad antimicrobiana de tres especies del género *Nitzschia* (*N. laevis*, *N. frustulum*, *N. frustulum* var. *perminuta*) contra *V.*

harveyi, *V. campbellii* y *V. alginolyticus*, para todos los casos se obtuvieron niveles indetectables entre los días 2 y 8, siendo *V. campbellii* y *V. alginolyticus* las especies de bacterias más susceptibles al efecto inhibitorio de *Nitzschia* spp., mientras que la especie más resistente fue *V. harveyi*.

De acuerdo con Amaro y Guedes (2011) y Pradhan *et al.* (2014) las microalgas tienen una gran capacidad para producir un amplio número de metabolitos con diversas acciones biológicas, entre las que se encuentra la actividad antimicrobiana. En este escenario, a partir de distintos estudios se han logrado identificar algunos compuestos como responsables de la actividad antimicrobiana a partir de diversos estudios: flavonoides (Mirzoeva *et al.*, 1997), ácidos grasos y lípidos (Lampe *et al.*, 1998; Desbois *et al.*, 2011), carotenoides (Cucco *et al.*, 2007), polifenoles y polisacáridos (Amaro *et al.*, 2011). Debido a la gran capacidad de las microalgas para producir metabolitos (Hernández-Pérez y Labbé, 2012), la adición de microalgas a los cultivos acuícolas es considerado como una alternativa contra el uso de antibióticos ante bacterias patógenas de importancia en acuicultura (Defoirdt *et al.*, 2011).

Uno de los principales metabolitos con actividad antimicrobiana producidos por las microalgas son los carbohidratos, Najdenski *et al.* (2013) extrajeron los exopolisacáridos (EPS) de la microalga roja *Rhodella reticulata*, los cuales presentaron efecto inhibitorio contra las especies de bacterias patógenas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Streptococcus pyogenes*.

En los últimos años, los ácidos grasos han tomado importancia como metabolitos con efecto inhibitorio y como potenciales candidatos para disminuir el uso de antibióticos en acuicultura (Defoirdt *et al.*, 2011). Desbois *et al.* (2009) evaluaron el efecto inhibitorio del ácido eicosapentanoico (EPA) proveniente de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* contra diversas especies de bacterias marinas patógenas tanto Gram negativas como Gram positivas. El EPA logró inhibir el crecimiento de distintas bacterias entre las que destacan *Listonella anguillarum*, *Micrococcus luteus*, *Photobacterium* sp. y *Planococcus citreus*.

Para los cocultivos de *N. subinflatooides* con *V. alginolyticus* y *V. campbellii*, el efecto inhibitorio podría deberse a la liberación de exopolisacáridos al medio de cultivo (Figura 41), ya que en ambos cocultivos se presentó una disminución significativa en el contenido de carbohidratos (<20 pg cel⁻¹) con respecto al tratamiento control (>35 pg cel⁻¹) (Figura 16). Esta disminución se presentó durante

la fase exponencial de crecimiento para *N. subinflatoides*, fase en la que se presentó el efecto inhibitorio contra *V. alginolyticus* y *V. campbellii*.

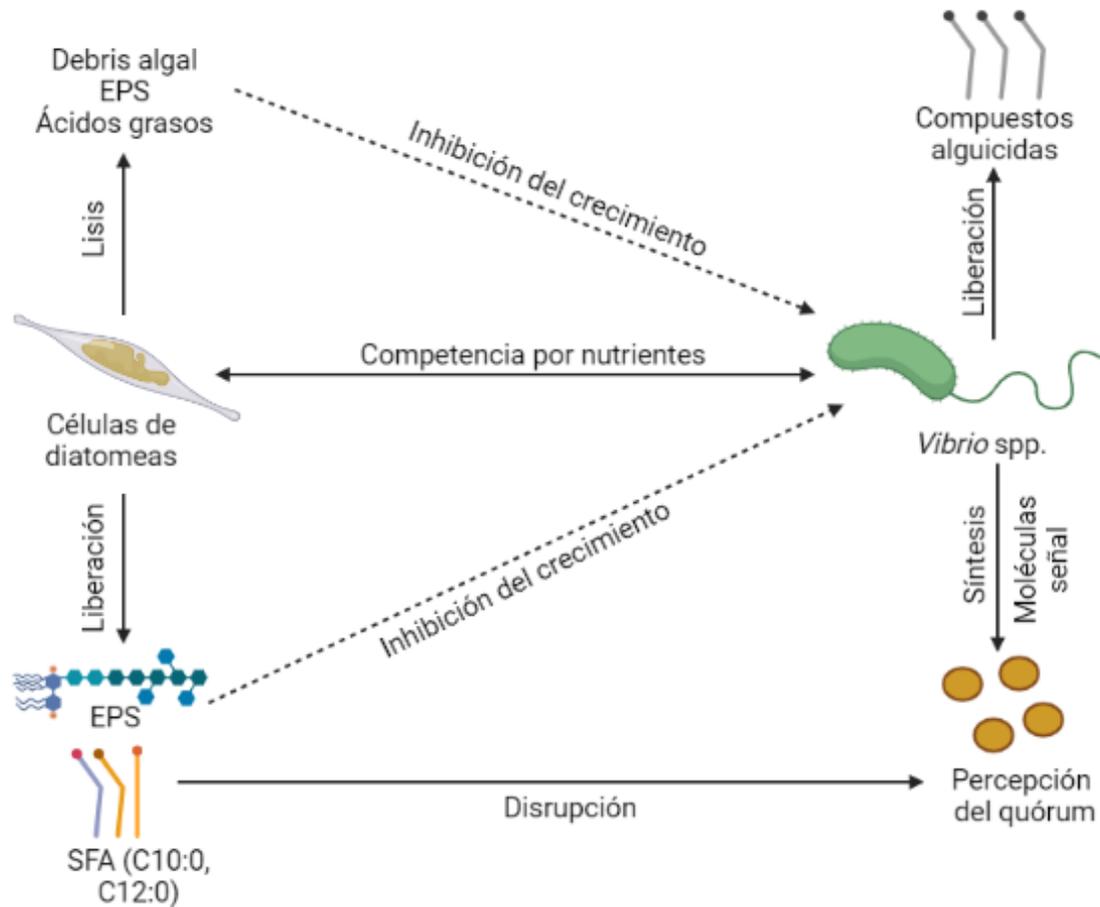


Figura 41. Diagrama general de los posibles mecanismos de inhibición de las diatomeas contra *Vibrio* spp. Las microalgas producen exopolisacáridos (EPS) bajo condiciones de estrés (presencia de compuestos alguicidas o competencia por nutrientes). Los ácidos grasos saturados son liberados en bajas concentraciones ocasionando la interrupción de la percepción del quórum. Durante la lisis celular de las diatomeas, se liberan al medio metabolitos como los EPS y ácidos grasos que inhiben el crecimiento de *Vibrio* spp. (*Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*). Flechas punteadas indican los posibles mecanismos de inhibición. Flechas con línea continua indican el posible mecanismo de interrupción de la percepción del quórum.

EPS: Exopolisacáridos; SFA: ácidos grasos saturados; C10:0: ácido cáprico; C12:0: ácido láurico. Figura realizada en BioRender.

Recientemente, diversos estudios se han centrado en la interrupción de la percepción del quórum, a partir de la liberación de compuestos con actividad antimicrobiana por parte de las microalgas (Natrah *et al.*, 2011) o de compuestos antimicrobianos naturales (Coutteau y Goossens, 2014). La percepción del quórum es un mecanismo de comunicación célula-célula principalmente descrito en

bacterias patógenas, incluidas las del género *Vibrio* (Winzer y Williams, 2001). A través de este fenómeno las bacterias liberan al medio moléculas señal o autoinductoras que pueden ser detectadas por bacterias adyacentes, una vez que las moléculas señal alcanzan cierta concentración permiten coordinar la expresión de ciertos genes con la finalidad de orquestar una respuesta conjunta intrabacteriana (por ejemplo, producción de toxinas o formación de biopelículas) (Milton, 2006; Defoirdt *et al.*, 2011)

Durante los retos de inhibición de *N. subinflatooides* el cocultivo con *V. harveyi* presentó un comportamiento similar al tratamiento control en diversas variables (crecimiento, peso seco total, carbohidratos, proteínas, Chl-a, Chl-b y carotenos). Estos resultados pueden deberse a la disrupción de la percepción del quórum de *V. harveyi* por parte *N. subinflatooides*, lo cual evitaría la síntesis de compuestos alguicidas por parte de *Vibrio* y, por lo tanto, las células de microalgas no presentarían estrés. Molina-Cárdenas *et al.* (2020) evaluaron el efecto de *V. cholerae* en el metabolismo de *Isochrysis galbana* al ser cocultivada y observaron que no se presentaron cambios en la densidad celular, tasa de crecimiento, peso seco orgánico, contenido de Chl-a y tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}) con respecto al cultivo monoespecífico de *I. galbana*, lo que sugiere alteración en la percepción del quórum de *V. cholerae* por *I. galbana*.

Coutteau y Goossens (2014), evaluaron el efecto de un extracto de compuestos naturales con actividad antimicrobiana en la supervivencia de *Artemia* al ser retada con *V. harveyi*. Se utilizaron tres concentraciones distintas del compuesto natural (0.30, 0.10 y 0.03%), para los tres casos la supervivencia de *Artemia* fue superior al 85%, lo que demuestra que a bajas concentraciones este compuesto es eficiente para controlar el crecimiento de *V. harveyi*. Por su parte, el tratamiento sin el compuesto natural presentó una supervivencia menor al 50%. Para las concentraciones más altas del compuesto natural (0.30 y 0.10%) se propone que la supervivencia de *Artemia* es debido al fuerte efecto bactericida contra *V. harveyi*, en tanto que, para la concentración más baja del compuesto (0.03%) no se presentó un cambio en la concentración de *V. harveyi* lo que sugiere que la supervivencia de *Artemia* se debe a la disrupción de la percepción del quórum de *V. harveyi* por parte del compuesto natural.

En el presente estudio, *N. subinflatooides* podría estar liberando productos extracelulares con efecto inhibitorio como son los ácidos grasos de cadena corta o carbohidratos, además, estos metabolitos podrían ser liberados al medio de cultivo mediante los eventos de lisis como consecuencia de la

muerte celular de la diatomea, dichas moléculas podrían ser las responsables de inhibir la percepción del quórum en los ensayos de inhibición con *V. harveyi* (Figura 41).

Para *N. thermalis*, la inhibición podría deberse a la alteración de la percepción del quórum, debido a que aparentemente no hay liberación de carbohidratos por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*) ya que no presentaron diferencias significativas para el contenido de carbohidratos en los cocultivos de *N. thermalis*. Además, el contenido de lípidos aumentó en todos los tratamientos con las especies de *Vibrio* estudiadas, lo que sugiere condiciones estresantes para las microalgas como fue descrito por otros autores (Xiao-Man *et al.* 2018). La liberación de carbohidratos y ácidos grasos al medio de cultivo por parte de las diatomeas en pequeñas concentraciones mediante los eventos de lisis celular, podrían estar inhibiendo la percepción del quórum de *Vibrio* spp. (Figura 41).

Durante la evaluación del contenido de bacterias heterotróficas en los retos de inhibición de *N. thermalis* se presentó un crecimiento en forma de biopelícula durante las primeras 48 h en los cocultivos de *N. thermalis* con *V. campbellii* y *V. alginolyticus*. Esta forma de crecimiento es conocida como “swarming” o movimiento en enjambre, dicho fenómeno es regulado mediante el sistema de comunicación intercelular denominado como percepción del quórum y consiste en un movimiento multicelular rápido y coordinado de bacterias únicamente sobre superficies húmedas (Marquina-Díaz y Santos de la Sen, 2010). Irazoiki *et al.* (2017) mencionan que algunas especies de bacterias patógenas incluidas las del género *Vibrio* (Ulitzur, 1975; Jaques y McCarter, 2006), emplean este tipo de movimiento, principalmente como mecanismo de defensa ya que les confiere resistencia a múltiples antibióticos por lo que el “swarming” es considerado como un estado de resistencia adaptativa o transitoria. Este fenómeno soporta fuertemente la producción de metabolitos con efecto antimicrobiano por parte de las diatomeas, como ha sido reportado en múltiples estudios (Naviner *et al.*, 1999; Molina-Cárdenas y Sánchez-Saavedra, 2017; Lauritano *et al.*, 2018).

El hecho de que *N. thermalis* pueda estar inhibiendo la percepción del quórum en medio líquido, pero no el movimiento en enjambre que se observó en medio sólido puede deberse a que *V. alginolyticus* y *V. campbellii* produzcan distintos tipos de moléculas señal o autoinductoras según la respuesta a orquestrar. Kariminik *et al.* (2017) reportan al menos tres tipos de moléculas autoinductoras pertenecientes a la familia de las Acyl-homoserina lactona (LasI, RhII, Esal) en

Pseudomonas aeruginosa, las cuales son liberadas dependiendo la respuesta bacteriana que se quiera desencadenar.

Por otra parte, las tres bacterias patógenas empleadas (*Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*) tienen la capacidad de crecer en medio "f", esto había sido previamente demostrado por Kokou *et al.* (2012) para cinco bacterias del género *Vibrio* (*V. lentus*, *V. alginolyticus*, *V. splendidus*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*). Esto indica que la inhibición de las tres especies de *Vibrio* (*Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*) es por acción de los metabolitos excretados por las dos especies de diatomeas (*Navicula subinflatooides* y *Nitzschia thermalis*) y no por la composición del medio o falta de nutrientes para las bacterias.

Para el caso de *V. alginolyticus*, la concentración disminuyó alrededor del 80% para el día 7; sin embargo, la inhibición de *V. alginolyticus* por ambas especies de diatomeas se presentó en el día 2, lo que sugiere que la inhibición de *V. alginolyticus* se debe a los metabolitos excretados por las dos especies de diatomeas. Kokou *et al.* (2012) observaron un comportamiento similar al de *V. alginolyticus* en *V. scophthalmi* en donde la densidad disminuyó a partir del día 2 al ser mantenidas en medio "f".

4.3 Crecimiento de las diatomeas en cocultivo con *Vibrio* spp.

Tanto para *N. subinflatooides* y *N. thermalis* el crecimiento se vio afectado negativamente por la presencia de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*). En el medio natural, las microalgas y las bacterias mantienen interacciones que pueden ser benéficas (positivas) o perjudiciales (negativas). La disminución en el crecimiento por parte de *N. subinflatooides* y *N. thermalis* puede deberse a la competencia por nutrientes o a la producción de compuestos alguicidas por parte de *Vibrio* spp. (Natrah *et al.*, 2013). Li *et al.* (2014) evidenciaron que *Vibrio* sp. BS02 produce un compuesto alguicida con actividad en el dinoflagelado *Alexandrium tamarense*, este compuesto fue identificado como ácido palmitoleico, para realizar los ensayos se realizó la extracción de este ácido graso; sin embargo, estudios previos realizados por estos autores demuestran que este compuesto alguicida puede ser secretado al ambiente o al medio de cultivo

en pequeñas concentraciones. La liberación de estos compuestos alguicidas puede ocasionar lisis celular en las diatomeas *N. subinflatooides* y *N. thermalis*, como lo describió Yoshinaga *et al.* (1995) para *Gimnodinium nagasakiense* por acción de una bacteria aislada de una muestra de mar. Por otra parte, la coexistencia de las dos especies de diatomeas (*N. subinflatooides* y *N. thermalis*) con *Vibrio* spp. puede ocasionar estrés en las especies de diatomeas debido a la liberación de compuestos alguicidas por parte de *Vibrio* spp. Estas condiciones de estrés frecuentemente afectan negativamente el crecimiento de las microalgas Xiao-Man *et al.* (2018).

4.4 Peso seco

Leal *et al.* 2013 evaluaron el peso seco total y el peso seco orgánico de *Navicula germanopolonica* mantenida en medio “f/2”, 24 °C, irradiancia de 125 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y cinco salinidades (20, 25, 30, 35, 45 unidades prácticas de salinidad (ups)). Los autores obtuvieron valores del peso seco total que oscilan entre 273.70 a 410.01 $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$, para el caso del peso orgánico los valores oscilaron entre 200.50 y 270.81 $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$. Los valores obtenidos en el presente estudio para *N. subinflatooides* son mayores en ambos casos a los reportados por Leal *et al.* (2013) para la fase exponencial; sin embargo, esto puede deberse a que la irradiancia y la temperatura fueron mayores lo que puede ocasionar estrés en las diatomeas y afectar su crecimiento.

Para *N. thermalis* se obtuvieron valores superiores a 1500 $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$, 900 $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ y 600 $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$, para PST, PSO y cenizas, respectivamente. Jiménez-Valera (2016) utilizó la misma cepa y obtuvo valores inferiores a 100 $\text{pg c\acute{e}l}^{-1}$ para las tres variables, al mantener los cultivos en medio “f”, 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de irradiancia y 20 °C. Estas diferencias podrían deberse a cambios en el tamaño celular de *N. thermalis* debido a las distintas temperaturas empleadas; sin embargo, en el estudio de Jiménez-Valera (2016) no se presentan datos referentes al tamaño celular de *N. thermalis*.

Para *N. subinflatooides* los resultados del PST y cenizas son consistentes con lo obtenido para el crecimiento, los menores valores se presentaron en los cocultivos con *V. alginolyticus* y *V. campbellii* y de igual forma que para el crecimiento esto podría deberse a la competencia por nutrientes y a la producción de compuestos alguicidas por parte de *Vibrio* spp. como ha sido descrito previamente

por otros autores (Natrah *et al.*, 2013). El PSO fue menor en los tratamientos con *Vibrio* spp. lo que podría deberse a cambios metabólicos en *N. subinflatooides* inducidos por la presencia de *Vibrio* spp. o bien debido a compuestos producidos por estas bacterias patógenas, lo anterior puede desencadenar estrés en las células de *N. subinflatooides* lo que induce cambios en el metabolismo para restaurar la homeostasis (Borowitzka, 2018). Estos cambios quedan de manifiesto en el estudio conducido por Perera *et al.* (2021) al evaluar la interacción entre las microalgas *Tetradesmus obliquus* y *Coelastrella* sp. con la bacteria *Variovorax paradoxus*, los cocultivos de las microalgas en conjunto con *V. paradoxus* presentaron un aumento en el contenido de lípidos, clorofila a, carotenoides y ácidos grasos poliinsaturados (DHA, EPA) en comparación con los monocultivos de ambas microalgas.

Con respecto a *N. thermalis* no se presentaron diferencias significativas en el PSO, contenido de cenizas y PST, lo que indica que la presencia de *Vibrio* spp. no ocasionó cambios en el contenido de biomasa de *N. thermalis*.

4.5 Composición proximal

Los valores de la composición proximal obtenidos por Leal *et al.* (2013) para *Navicula germanopolonica* oscilaron entre 19-28% para proteínas, 8-11% para carbohidratos y 19-26% para lípidos durante la fase exponencial. Los resultados obtenidos para proteínas y carbohidratos a las mayores salinidades (35 y 40 ups) son similares a los obtenidos en este estudio para el tratamiento control (*N. subinflatooides*), mientras que para los lípidos el valor más similar se presentó a la menor salinidad (20 ups). Si bien la salinidad por sí sola no es una variable determinante con respecto al crecimiento y la composición proximal, puede ocasionar cambios importantes cuando se relaciona con otras variables como la temperatura (Xiao-Man *et al.*, 2018).

Fimbres-Olivarría *et al.* (2014) evaluaron la composición proximal de *Navicula* sp. cultivada a dos intensidades de luz y tres distintas longitudes de ondas. Al mantener el cultivo a una irradiancia de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y luz blanca (400-750 nm) (condiciones similares a las utilizadas en este estudio) se obtuvo la siguiente composición proximal: proteínas (15.02%), carbohidratos (3.49%) y lípidos

(30.34%), estos resultados son consistentes a los obtenidos en este estudio para el tratamiento control. Para el caso de los lípidos los resultados coinciden con lo reportado por Xiao-Man *et al.* 2018 quienes mencionan que el contenido de lípidos en las microalgas suele oscilar entre el 20 al 50% del peso seco de la célula.

El contenido de carbohidratos presentó una disminución en los tratamientos de *N. subinflatooides* en presencia de *V. alginolyticus* y *V. campbellii*. De acuerdo con Patel y Prajapati (2013) y Liu *et al.* (2016) bajo condiciones desfavorables como desecación, estrés osmótico y la presencia de compuestos alguicidas o antibióticos las bacterias y microalgas pueden producir exopolisacáridos (EPS), los cuales brindan protección celular. En 2007, Durlu-Özkaya *et al.* evaluaron la sensibilidad de 20 cepas de la bacteria *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* al ser retadas contra bacteriófagos y el antibiótico nisina. Los resultados mostraron que las bacterias con una capacidad de producir concentraciones de EPS relativamente altas (>31 mg EPS L⁻¹) eran resistentes a los efectos de los bacteriófagos y la nisina. Respecto al mecanismo de protección, Looijesteijn *et al.* (2001) y Durlu-Özkaya *et al.* (2007) sugieren que los EPS son liberados al medio por los microorganismos y posteriormente, los microorganismos se rodean de una capa de EPS la cual le brinda protección contra diversas condiciones desfavorables. Para el caso de la producción de compuestos alguicidas por parte de *Vibrio* spp. esta capa de EPS podría brindar a *N. subinflatooides* protección enmascarando los objetivos del compuesto alguicida en la diatomea.

Además, los EPS confieren resistencia contra diversos agentes antimicrobianos, entre los que se encuentran los compuestos alguicidas (Nwodo *et al.*, 2012), estos compuestos han sido identificados en las bacterias del género *Vibrio*. Li *et al.* (2014) demostraron que *Vibrio* sp. (BS02) presenta actividad alguicida contra *Alexandrium tamarense*, el compuesto alguicida fue identificado como ácido palmitoleico. Además de brindar protección a la célula, se ha demostrado que los EPS presentan actividad antimicrobiana contra diversas bacterias. Aullybux *et al.* (2019) evaluaron 40 EPS provenientes de una bacteria marina contra siete especies de bacterias patógenas (*Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. saprophyticus*, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis*). Los resultados mostraron que 38 de los 40 tipos de EPS evaluados presentaron actividad antimicrobiana contra al menos un tipo de bacteria. Además, en los últimos años estos compuestos han recibido especial atención debido a que pueden presentar actividades anticarcinogénicas (Wu *et al.*, 2020), antioxidantes (Leung *et al.*, 2009) y antimicrobianas (Nehal *et*

al., 2019). En los cocultivos con *V. campbelli* y *V. alginolyticus* el contenido de proteínas durante la fase exponencial disminuyó con respecto al tratamiento control, esto podría estar relacionado con la producción de EPS, ya que las proteínas son el segundo componente principal de estas macromoléculas como ha sido descrito por otros autores para diversas especies de cianobacterias (Ozturk y Aslim, 2010).

El contenido de lípidos disminuyó por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*). Esta disminución puede deberse al gasto energético que representa la síntesis de metabolitos con actividad antibacteriana. Si bien, la principal función de los lípidos es la reserva de energía, estudios realizados por Sushchik *et al.* (2001) y Abomohra *et al.* (2014) demuestran que las microalgas tienen la capacidad de liberar ácidos grasos al medio con la finalidad de atraer bacterias; sin embargo, las microalgas podrían liberar estos ácidos grasos con otros fines, como la actividad antibacteriana. Como se mencionó anteriormente, los ácidos grasos han demostrado una gran capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas y, por lo tanto, representan una novedosa alternativa contra el uso de los antibióticos (Desbois *et al.*, 2009; Bhagavathy *et al.*, 2011; Alsenani *et al.*, 2020).

Con respecto al contenido de carbohidratos en *N. thermalis* no se presentaron diferencias significativas por la adición de *Vibrio* spp. en ambas fases de crecimiento de los cultivos de la especie de diatomea. Para los cocultivos de *N. thermalis* con las tres especies de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*), esto podría deberse a la disrupción de la percepción del quórum por parte de la especie de diatomea. *N. thermalis* podría estar liberando compuestos con efecto antimicrobiano como carbohidratos o ácidos grasos en concentraciones bajas con la finalidad de alterar la percepción del quórum, como lo describe Coutteau y Goossens, 2014 al emplear concentraciones bajas de un compuesto natural (0.03%) contra *V. harveyi*, dicho compuesto natural alteró la percepción del quórum de *V. harveyi*. La inhibición de la percepción del quórum de las tres especies de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*) por parte de *N. thermalis* evitaría una respuesta en conjunto por parte de las bacterias (por ejemplo, liberación de compuestos alguicidas), por lo tanto, el contenido de carbohidratos en las diatomeas no se ve modificado, debido a que no se requiere una protección celular contra los compuestos alguicidas por parte de los carbohidratos.

Para el contenido de proteínas el cocultivo con *V. harveyi* (502.97 ± 94.31 pg cel⁻¹) presentó un aumento con respecto al tratamiento control (268.69 ± 11.73 pg cel⁻¹). La presencia de *V. harveyi* podría aumentar el contenido de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), como sucede en las microalgas *Coelastrella* sp. y *Tetradesmus obliquus* al ser cocultivadas con la bacteria *Variovorax paradoxus* (Perera *et al.*, 2021). Este aumento de proteínas puede deberse a la síntesis de proteínas con actividad antioxidante como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) como mecanismos de respuesta hacia el estrés oxidativo (Calderón-Delgado *et al.*, 2019). Los mecanismos de respuesta consisten en sintetizar sistemas enzimáticos, estos se coordinan de manera conjunta para proteger a las microalgas de los factores adversos que ocasiona el estrés oxidativo, entre dichos factores se encuentran el daño a proteínas, lípidos y ADN (Aránguiz *et al.*, 2009).

Al contrario de *N. subinflatooides*, el contenido de lípidos en *N. thermalis* aumentó por la adición de las tres especies de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*) en la fase exponencial. La acumulación de lípidos puede ser provocada por condiciones de estrés como la limitación de nutrientes (Xiao-Man *et al.*, 2018). Esta tendencia pudo haber ocurrido debido a la competencia de *N. thermalis* con *Vibrio* spp. y por este motivo se encontró un aumento en el contenido de lípidos. Además, Perera *et al.* (2021) evaluaron los cambios fisiológicos en las microalgas *Tetradesmus obliquus* IS2 y *Coelastrella* sp. al ser cocultivadas con la bacteria *Variovorax paradoxus* IS1. Estos autores observaron que los cocultivos presentaban altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). La acumulación de lípidos también puede deberse a la presencia de ROS, ya que los lípidos, principalmente los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés) confieren a las células una fuerte resistencia a la oxidación (Richard *et al.*, 2008).

4.6 Pigmentos

La concentración de Chl-a y Chl-c disminuyó en los cocultivos con *V. alginolyticus* y *V. campbellii*, como se mencionó líneas arriba, la presencia de *Vibrio* spp. puede ocasionar aumento en las ROS (Perera *et al.*, 2021). Sharma *et al.* (2019) menciona que algunos factores estresantes como altas irradiancias o incremento en las ROS pueden ocasionar disminución de la eficiencia fotosintética,

estrés oxidativo y afectar la síntesis de clorofila, por lo que la disminución de las clorofilas (a y c) podría deberse al estrés oxidativo ocasionado por la presencia de *V. alginolyticus* y *V. campbellii*.

Además, de acuerdo con Gregor y Marsálek (2004), el contenido de Chl-a durante la fase exponencial es directamente proporcional a la densidad celular, por lo que la concentración de Chl-a se puede utilizar para estimar de manera indirecta la biomasa de las microalgas, ya que es el principal pigmento fotosintético presente en estos microorganismos. Lo anterior es consistente con los resultados obtenidos para la densidad celular (Figura 3).

Respecto a la Chl-c, esta es un pigmento accesorio presente en las diatomeas en lugar de la Chl-b (Kuczynska *et al.*, 2015). En los cocultivos con *V. campbellii* y *V. alginolyticus* durante la fase exponencial de *N. thermalis* el contenido de Chl-c fue mayor con respecto al tratamiento control. Esto es consistente con los resultados obtenidos para la eficiencia fotosintética (Figura 39), donde los cocultivos con *V. campbellii* y *V. alginolyticus* fueron fotosintéticamente más eficientes conforme aumentaron los niveles de irradiancia. Mysliwa-Kurdziel *et al.* (2019) mencionan que la función de la Chl-c es ayudar a la Chl-a absorber la luz solar y su síntesis está relacionada al inicio de la fotosíntesis.

El contenido de carotenos durante la fase exponencial en *N. subinflatooides* con adición de *V. alginolyticus* y *V. campbellii* presentó un aumento con respecto al tratamiento control. De acuerdo con Xiao-Man *et al.* (2018), al igual que los lípidos, la acumulación de carotenos puede deberse a condiciones de estrés ocasionadas por la falta de nutrientes o a la presencia de metabolitos o compuestos que pueden ser secretados por *Vibrio* spp. como mecanismo de defensa. Estas condiciones estresantes pueden afectar de manera adversa el crecimiento de las microalgas, esto es consistente con los resultados obtenidos para el crecimiento de *N. subinflatooides* con adición de *V. alginolyticus* y *V. campbellii*, tratamientos donde se obtuvieron las menores densidades celulares.

Para *N. thermalis* se obtuvo una tendencia similar a *N. subinflatooides* durante la fase estacionaria por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*), de igual manera el crecimiento de *N. thermalis* en los tres cocultivos, fue menor al crecimiento en el tratamiento control. La disminución en el crecimiento de *N. thermalis* en cocultivo con las tres especies de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*) puede deberse a condiciones de estrés ocasionadas por la presencia de *Vibrio* spp., compuestos producidos por estas bacterias y falta de nutrientes.

4.7 Parámetros fotosintéticos

Para el caso de *N. subinflatooides* durante la fase exponencial, la pendiente inicial (α), la tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}) y la irradiancia de saturación (E_k) aumentaron por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*), excepto para el parámetro α en el cocultivo con *V. harveyi*. En la fase estacionaria de los cultivos de *N. subinflatooides*, los parámetros ETR_{max} y E_k aumentaron en todos los tratamientos con *Vibrio* spp. Estos tres parámetros están relacionados con la eficiencia fotosintética, por lo que su aumento indica una mejora o potenciamiento del proceso fotosintético.

Leone *et al.* (2021) lograron mejorar la eficiencia fotosintética de la diatomea *Thalassiosira weissflogii* mediante la adición al medio de cultivo de un colorante rojo (cianina), el cual absorbe a una longitud de onda que oscila entre los 570 y 650 nm. Este pigmento cianina tiene la capacidad de penetrar la membrana celular de la diatomea *T. weissflogii* y actuar como una antena molecular que aumenta la recolección de la luz, debido a que la cianina absorbe energía a longitudes de ondas a las que los pigmentos fotosintéticos presentes en las diatomeas no pueden absorber. Este incremento ocasiona un aumento en la tasa de transporte de electrones lo que a su vez provoca una mayor producción de adenosín trifosfato (ATP) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Estos incrementos conllevan a que las células de la especie de diatomea mejoren su actividad fotosintética. Los pigmentos que pudieran ser liberados por *Vibrio* spp. y que permanecen en el medio de cultivo, es decir, que no penetran hacia las células de las diatomeas (*N. subinflatooides* y *N. thermalis*), pueden favorecer una mayor absorción de fotones de longitudes de ondas que no pueden ser absorbidos por los pigmentos presentes en las diatomeas. Burak *et al.* (2019) lograron potenciar la actividad fotosintética de la microalga *Dunaliella salina* mediante el empleo de dos colorantes (cumarina y solvente naranja). En este estudio, los colorantes fueron colocados alrededor del biorreactor y no directamente al medio para evitar una posible toxicidad de los colorantes hacia la microalga. Los resultados en la actividad fotosintética de *D. salina* se vieron aumentados al ser cultivadas con los colorantes cumarina y solvente naranja.

Si bien en el presente trabajo no se adicionaron pigmentos, moléculas de este tipo pueden ser aportadas al medio de cultivo por *Vibrio* spp. Alihosseini *et al.* (2008) lograron aislar a *Vibrio gazogenes* de sedimentos marinos y se demostró que presenta gran capacidad para producir un

pigmento rojo conocido como prodigiosina a partir de espectroscopía de masas. Borić *et al.* (2011) evidenciaron que la síntesis de este pigmento prodigiosina provee protección contra el estrés ocasionado por la radiación ultravioleta (UV) en *Vibrio* sp. DSM 14379. Además, se determinó que la máxima absorbancia de este pigmento prodigiosina es de 530 nm, absorbancia similar al pigmento cianina utilizada en el estudio de Leone *et al.* (2021). A pesar de que no hay reportes de que estos pigmentos puedan ser secretados al medio, en este caso los pigmentos que pudieran ser producidos por *Vibrio* spp. podrían ser liberados al medio durante la lisis celular que experimentan las bacterias de manera natural, o bien, por el efecto inhibitorio de las diatomeas. Una vez en el medio, los pigmentos pueden difundir hacia el interior de las diatomeas en donde pueden actuar como antenas moleculares de recolección de luz, lo que las vuelve más eficientes para llevar a cabo el proceso de fotosíntesis (Leone *et al.*, 2021).

Otro de los parámetros fotosintéticos evaluados fue Fv/Fm, el cual se refiere a la máxima eficiencia a la que la luz absorbida por las antenas de captación de luz del fotosistema II se convierte en energía química (Baker y Rosenqvist, 2004). Los resultados obtenidos tanto para el tratamiento control como para los tratamientos con *Vibrio* spp. presentaron valores entre 0.52 a 0.62 durante la fase exponencial. La tendencia obtenida para dichos valores puede considerarse como óptima de acuerdo con Tan *et al.* (2019), quienes evaluaron valores de Fv/Fm de 14 especies de algas de distintos grupos entre las que se encuentran cuatro especies de diatomeas (*Skeletonema costatum*, *Chaetoceros curvisetus*, *C. debilis*, *Coscinodiscus* sp.), en donde los valores máximos obtenidos oscilaron entre 0.57 a 0.62 y el valor promedio obtenido para este grupo fue de 0.60. Durante la fase estacionaria los valores de Fv/Fm disminuyeron en todos los tratamientos y oscilaron en valores entre 0.35 a 0.40. Estos menores valores de Fv/Fm pueden deberse a la falta de nutrientes en la fase estacionaria, ya que los resultados obtenidos para los tratamientos con *Vibrio* spp. con respecto al tratamiento control no presentaron diferencias. Tan *et al.* (2019) mencionan que, bajo condiciones limitantes de nitrógeno y fósforo, este parámetro puede alcanzar valores de 0.2. Una disminución de los valores óptimos en Fv/Fm (valores entre 0.57 a 0.62) indican una reducción en la eficiencia fotoquímica del fotosistema II y daños en el aparato fotosintético (Jiménez-Suanca *et al.*, 2015).

Para *N. thermalis* en cocultivo con *V. alginolyticus* y *V. campbellii* los valores de α , ETR_{max} y Ek aumentaron con respecto al tratamiento control. Estos cocultivos presentaron una mayor eficiencia fotosintética durante la fase exponencial. De forma similar a lo descrito para *N. subinflatooides*, el

potenciamiento fotosintético puede deberse a la liberación de prodigiosina por parte de *Vibrio* spp. Con respecto a los valores de Fv/Fm no se presentaron diferencias entre los tratamientos en ambas fases de crecimiento de *N. thermalis* y los valores oscilaron entre 0.52-0.67, por lo que de acuerdo con Tan *et al.* (2019) la eficiencia fotosintética del fotosistema II se encuentra en estado óptimo.

4.8 Composición de ácidos grasos

Teoh *et al.* (2004) evaluaron el perfil de ácidos grasos de seis especies de microalgas Antárticas entre las que se encuentra la cepa *Navicula* UMACC 231, los cultivos de *Navicula* fueron mantenidos en medio Provasoli a seis distintas temperaturas (4, 6, 9, 14, 20, 30 °C). Los cultivos mantenidos a 20 °C (temperatura más similar a la empleada en este estudio) presentaron un contenido de SFA (37.18%) similar al obtenido en el presente estudio; sin embargo, el contenido de MUFAs (55.40%) y de PUFAs (12.70%) fueron muy distintos a los valores obtenidos para *N. subinflatoides*. Estas diferencias pueden deberse a que la cepa *Navicula* UMACC 231 se encuentre estresada debido a que está adaptada a temperaturas bajas, ya que los cultivos mantenidos a 4 °C presentaron resultados muy similares a los obtenidos en este estudio a 22 °C.

En ambas especies de diatomeas utilizadas en este estudio, el perfil de ácidos grasos se vio modificado por la adición de las tres especies de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*). Molina-Cárdenas *et al.* (2020) evaluaron el efecto de *V. cholerae* en el perfil de ácidos grasos de *I. galbana* al ser cocultivadas. Los resultados obtenidos por estos autores mostraron un aumento en los ácidos grasos linoleico, linolénico, gamma-linolénico, eicosatrenoico y eicosatetraenoico, mientras que el ácido cis-9-octadenoico se vio drásticamente disminuido en el cocultivo (1.82%) en comparación con el monocultivo de *I. galbana* (12.74%). En la presente investigación, se encontró que la proporción de los ácidos grasos saturados (SFA) disminuyó en *N. subinflatoides*, en particular el ácido cáprico (C10:0) disminuyó en el cocultivo con *V. harveyi* (0.50%), con respecto al monocultivo de *N. subinflatoides* (4.18%). Sushchik *et al.* (2001) mencionan que las microalgas tienen la capacidad de excretar ácidos grasos de cadena corta y media al ambiente o al medio de cultivo, por lo que *N. subinflatoides* podría estar liberando el ácido cáprico (C10:0) para llevar a cabo la disrupción de la percepción del quórum en *V. harveyi* (Figura 41). Esta tendencia puede ser similar

a lo evaluado en el estudio de Coutteau y Goossens (2014), donde una mezcla de compuestos naturales con actividad antimicrobiana en baja concentración (0.03%) logró inhibir la percepción del quórum en *V. harveyi*. También el C10:0 puede presentar actividad antimicrobiana, lo cual fue demostrado en el estudio de Huang *et al.* (2011) donde lograron inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans*, *S. gordonii* y *S. sanguis*, y que corresponden a tres especies de bacterias patógenas de importancia en odontología; aunado a esto, el C10:0 presentó la menor concentración mínima inhibitoria (IC80) junto con el ácido caprílico (C8:0).

Otro de los ácidos grasos que presentó cambios en su concentración fue el caproico (C6:0), el cual no fue detectado en el monocultivo de *N. subinflatoides*, pero sí en los cocultivos con *V. alginolyticus* (0.11%) y *V. campbellii* (0.19%). Debido a que el C6:0 se encuentran en bajas concentraciones, este tipo de ácidos grasos podría estar siendo sintetizados por *N. subinflatoides* para ser liberado al medio debido a su actividad antimicrobiana. Huang *et al.* (2011) demostraron que el C6:0 presentó efecto inhibitorio contra bacterias patógenas como *S. mutans* y *S. gordonii*.

Para los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de *N. subinflatoides* se observó un aumento en la concentración de los ácidos linoleico, alfa-linolénico, eicosadienoico y docosadienoico por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*). La presencia de las bacterias en los cocultivos puede aumentar las ROS en *N. subinflatoides*, por lo que el aumento de estos PUFAs, puede ser un resultado de los mecanismos de defensa ante el estrés oxidativo, ya que estos confieren una fuerte resistencia a la oxidación (Richard *et al.*, 2008).

Además, diversos estudios han demostrado la actividad antimicrobiana de PUFAs provenientes de cultivos de microalgas, como el EPA (Desbois *et al.*, 2009), ácido linoleico y el docosahexaenoico (DHA) (Alsenani *et al.*, 2020). Si bien, no hay evidencia de que los PUFAs puedan ser liberados al medio, estos pueden llegar al medio de cultivo mediante la lisis celular y de esta forma ejercer su actividad antimicrobiana (Figura 41).

De manera general, los cocultivos de *N. subinflatoides* con las tres especies de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*) presentaron una disminución en el contenido total de PUFAs. La disminución del contenido de PUFAs en los cultivos de *N. thermalis*, podría traer como consecuencias modificaciones en el valor nutricional de *N. subinflatoides*, esto es si se utiliza como medida profiláctica en cultivo de agua verde, o bien, como aporte de alimento para especies

acuáticas como el camarón. En los cultivos de camarón, el contenido de bacterias del género *Vibrio* se encuentran usualmente en concentraciones bajas (Gopal *et al.*, 2004), lo que ocasionaría una disminución del contenido de PUFAs. La importancia de los PUFAs en los organismos acuáticos se debe a que estos no pueden sintetizar este tipo de ácidos grasos, por lo que se les considera como ácidos grasos esenciales. Los organismos acuáticos requieren PUFAs ya que la deficiencia de estos ácidos grasos puede afectar el crecimiento, su reproducción, desencadenar patologías y en el peor de los escenarios ocasionar la muerte de los organismos acuáticos (Tocher, 2010).

Para el caso de *N. thermalis*, Rodríguez-Nuñez y Toledo-Agüero (2017) evaluaron el perfil de ácidos grasos de dos diatomeas (*Chaetoceros* sp. y *Nitzschia* sp.) aisladas en la costa del Pacífico Central de Costa Rica. Para *Nitzschia* sp. los cultivos fueron mantenidos en medio f/2 y a una irradiancia de 55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los resultados para la fase estacionaria del crecimiento fueron: SFAs (24.90%), MUFAs (42.30%) y PUFAs (32.80%). Para el caso de *N. thermalis* el contenido de MUFAs (42.48%) fue muy similar al de *Nitzschia* sp.; sin embargo, el contenido de SFAs y de PUFAs presentaron diferencias, las cuales pueden deberse a la diferencia de las irradiancias empleadas en ambos estudios.

El ácido láurico (C12:0) en los cultivos de *N. thermalis* disminuyó por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*) a niveles muy bajos (<0.07%) con respecto al tratamiento control (1.53%). La tendencia anterior, podría indicar la liberación de este ácido graso para inhibir el crecimiento de *Vibrio* spp. o bien, alterar la percepción del quórum (Coutteau y Goossens, 2014). Matsue *et al.* (2019) evaluaron la actividad antibacteriana del ácido C12:0 y demostraron que este presentó actividad contra bacterias de importancia clínica pertenecientes al género *Streptococcus* (*S. agalactiae*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. sanguinis*).

Ruzin y Novick (2001) evidenciaron que el C12:0 reduce la expresión de factores de virulencia en la bacteria patógena *S. aureus* mediante el bloqueo de señales de traducción, por lo que la disminución de este ácido graso en los tratamientos con *Vibrio* spp. puede deberse a que *N. thermalis* lo esté liberando para evitar o disminuir la expresión de factores de virulencia o compuestos aligucidas producidos por las bacterias patógenas.

Para el caso de los PUFAs, se observó un incremento en *N. thermalis* en 9 de los 11 ácidos grasos de este tipo evaluados por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*). Lutz *et al.* (2018) menciona que la interacción entre microalgas y bacterias mejora la

composición química de las microalgas, lo que se traduce como un incremento en moléculas de importancia económica como lo son los ácidos grasos. La presencia de bacterias en los cultivos de microalgas puede ocasionar estrés en las microalgas, estas condiciones estresantes pueden inducir cambios en el metabolismo para restaurar la homeostasis como sucede en la especie de diatomea *Phaeodactylum tricornutum* al ser cocultivada con *Stappia* sp. K01 (Vuong *et al.*, 2019).

Al contrario de lo obtenido con *N. subinflatoides*, los niveles totales de PUFAs en *N. thermalis* se incrementaron en todos los tratamientos con *Vibrio*. Debido a que la adición de *Vibrio* spp. induce un aumento en los niveles de PUFAs, podrían realizarse estudios dirigidos a la inactivación de la patogenicidad de *Vibrio* spp. o bien, realizar cocultivos con otras bacterias que no sean patógenas para evaluar si los niveles de PUFAs en *N. thermalis* aumentan. El incremento de este tipo de ácidos grasos en *N. thermalis* podría ser aprovechado para alimentar organismos acuáticos, los cuales no pueden sintetizar este tipo de ácidos grasos, por lo que se les considera como ácidos grasos esenciales (Tocher, 2010).

A pesar de que la composición de ácidos grasos de *N. subinflatoides* y *N. thermalis* se realizó de manera intracelular, Jüttner (2001) y Desbois y Smith (2011) mencionan que estas moléculas tienen un papel muy poco conocido que consiste en brindar defensa en organismos eucariotas unicelulares contra amenazas bacterianas. En el caso de las microalgas, los ácidos grasos principalmente se encuentran en los lípidos que forman las membranas celulares y estructuras de almacenamiento energético; sin embargo, durante la lisis celular las enzimas lipolíticas de las microalgas liberan ácidos grasos provenientes de los lípidos celulares, en su mayoría los ácidos grasos mayormente liberados son tanto mono como poliinsaturados (Cutignano *et al.*, 2006). Estos ácidos grasos resultado de la lisis celular de las microalgas, presentan una potente actividad antimicrobiana, lo que brinda protección a las microalgas amenazadas por diversos patógenos, en este caso contra *Vibrio* spp. El efecto inhibitorio de las microalgas a partir de ácidos grasos conlleva a que las primeras generaciones de microalgas no sobrevivan; sin embargo, los ácidos grasos liberados a partir de las células de microalgas dañadas por patógenos actuarán sobre el resto de los patógenos presentes en el medio ambiente o de cultivo, lo que confiere protección a las microalgas adyacentes.

Los resultados obtenidos para *Navicula subinflatoides* y *Nitzschia thermalis* al ser cocultivadas con las tres especies de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*), muestran que ambas especies

de diatomeas pueden ser empleadas como métodos alternativos a los antibióticos para controlar el crecimiento de bacterias patógenas del género *Vibrio* en cultivos de importancia acuícola (por ejemplo, camarón o abulón).

Capítulo 5. Conclusiones

La densidad celular de *N. thermalis* disminuyó por la adición de *V. campbellii* y *V. harveyi*, mientras que, para *N. subinflatooides* la disminución de la densidad celular fue por la adición de *V. campbellii* y *V. alginolyticus*.

Los cultivos de las diatomeas *N. subinflatooides* y *N. thermalis* mostraron un alto efecto inhibitorio en el crecimiento de *V. alginolyticus*, *V. campbellii* y *Vibrio harveyi* durante la fase exponencial del crecimiento y este efecto inhibitorio se mantuvo hasta la fase estacionaria, en donde los conteos de *Vibrrios* no fueron detectados en filtrados de 10 mL.

La bacteria *V. alginolyticus* fue más susceptible al efecto inhibitorio de *N. subinflatooides* y *N. thermalis*. Por el contrario, la especie de bacteria más resistente a la inhibición fue *V. campbellii* para ambas especies de diatomeas estudiadas.

Durante la fase exponencial de crecimiento de *N. subinflatooides* el peso seco orgánico disminuyó por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*).

El contenido de carbohidratos en *N. subinflatooides* disminuyó por la adición de *V. alginolyticus* y *V. campbellii* durante la fase exponencial de crecimiento, mientras que durante la fase estacionaria el contenido de carbohidratos aumentó.

El contenido de lípidos aumentó durante la fase exponencial para *N. thermalis* por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*) y para *N. subinflatooides* disminuyó el contenido de lípidos. Sin embargo, durante la fase estacionaria del crecimiento el contenido de lípidos para *N. thermalis* aumentó.

Para *N. subinflatooides* el contenido de proteínas disminuyó por la adición de *V. alginolyticus* y *V. campbellii*, mientras que para *N. thermalis* la adición de *V. harveyi* aumentó el contenido de proteínas durante la fase exponencial.

El contenido de clorofila a y c (Chl-a y Chl-c) se vio modificado por la adición de *V. alginolyticus* y *V. campbellii* durante ambas fases de crecimiento de *Navicula subinflatooides*, mientras que para *N. thermalis* el contenido de Chl-c aumentó por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*) durante la fase exponencial del crecimiento.

Para *N. thermalis* y *N. subinflatooides* durante la fase estacionaria el contenido de carotenoides aumentó por la adición de las tres especies de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*), excepto para *N. subinflatooides* en presencia de *V. harveyi* en la cual disminuyó el contenido de carotenoides.

La eficiencia fotosintética de *N. subinflatooides* aumentó por la adición de los tres tipos de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*) durante la fase exponencial de crecimiento.

Para *N. thermalis* el contenido total de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y ácidos grasos saturados (SFAs) aumentó por la adición de las tres especies de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*), mientras que, el contenido total de ácidos grasos monosaturados (MUFAs) disminuyó. Para *N. subinflatooides*, el contenido de PUFAs aumentó por la adición de las tres especies de *Vibrio*.

Los cultivos de las diatomeas *N. subinflatooides* y *N. thermalis* pueden utilizarse como método profiláctico contra *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii* en cultivos de etapas larvarias de especies de importancia acuícola como camarón, abulón, erizo y pepino de mar.

Capítulo 6. Recomendaciones

- Realizar los retos de inhibición con concentraciones iniciales menores de las diatomeas *N. subinflatooides* y *N. thermalis* con el fin de encontrar la densidad celular mínima de las diatomeas para inhibir el crecimiento de las tres especies de *Vibrio* (*Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus* y *V. campbellii*).
- Evaluar la composición del medio de cultivo (carbohidratos, ácidos grasos, pigmentos) en los retos de inhibición para establecer el posible mecanismo de inhibición.
- Utilizar las diatomeas *N. subinflatooides* y *N. thermalis* en cultivos de importancia acuícola como el camarón retado con las tres especies de *Vibrio* (*Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus* y *V. campbellii*) para evaluar la supervivencia y el efecto en la nutrición del camarón.
- Identificar el/los posibles metabolitos con efecto inhibitorio producidos por las diatomeas *N. subinflatooides* y *N. thermalis* contra las tres especies de *Vibrio* (*Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus* y *V. campbellii*).

Literatura citada

- Abomohra, A.F., El-Sheekh, M., Hanelt, D. 2014. Extracellular secretion of free fatty acids by the chrysophyte *Ochromonas dánica* under photoautotrophic and mixotrophic growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30, 3111-3119.
- Aguilar-May, B. 2002. Remoción de nutrientes con microalgas marinas en un medio equivalente al efluente promedio de una granja camaronícola. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Ensenada, Baja California, México. 104 pp.
- Aguirre-Guzmán, G., Ascencio, F. 2000. Infectious disease in shrimp with aquaculture potential. *Recent Research Developments in Microbiology*. 4, 333-348.
- Aguirre-Guzmán, G., López-Acevedo, E.A., Vázquez-Sauceda, M.L. 2013. *Vibrio harveyi* effect under survival of *Litopenaeus vannamei* larvae. *Scientia Agropecuaria*. 4, 121-127.
- Aguirre-Guzmán, G., Mejía-Ruíz, H., Ascencio F. 2004. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. *Aquaculture Research*. 35, 1395-1404.
- Ahmadivand, S., Soltani, M., Mardani, K., Shokrpour, S., Hassanzadeh, R., Ahmadpoor, M., Rahmati-Holasoo, H., Meshkini, S. 2017. Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) outbreak in farmed rainbow trout in Iran: Viral isolation, pathological findings, molecular confirmation, and genetic analysis. *Virus Research*. 229, 17-23.
- Alihosseini, F., Ju, K.S., Lango, J., Hammock, B.D., Sun, G. 2008. Antibacterial colorants: characterization of prodigionines and their applications on textile materials. *Biotechnology Progress*. 24(3), 1-16.
- Alsenani, F., Tupally, K.R., Chua, E.T., Eltahany, E., Alsufyani, H. 2020. Evaluation of microalgae and cyanobacteria as potential sources of antimicrobial compounds. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 28, 1834-1841.
- Amaro, H.M., Guedes, C.A, Malcata, F.X. 2011. Antimicrobial activities of microalgae: an invited review. En: A. Méndez-Vilas (Ed.), *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Formatex, Porto, Portugal. pp 1272-1280.
- Anguiano-Beltrán, C. 1996. Patogenicidad de *Vibrio alginolyticus* sobre larvas del mejillón europeo *Mytilus galloprovincialis* y larvas y poslarvas de abulón rojo *Haliotis rufescens*. Tesis de maestría en ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 60 pp.

- Anguiano-Beltrán, C., Searcy-Bernal, R., Lizárraga-Partida, M.L. 1998. Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on larvae and postlarvae of the red abalone *Haliotis rufescens*. Diseases of Aquatic Organisms. 33, 119-122.
- Anguiano-Beltrán, C., Lizárraga-Partida, M.L., Searcy-Bernal, R. 2004. Effect of *Vibrio alginolyticus* on larval survival of the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. Diseases of Aquatic Organisms. 59, 119-123.
- Aránguiz, F., Gaete, H., Hidalgo, M.E., Lobos, G. 2009. Daño oxidativo en la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* expuesta a aguas receptoras de un efluente minero en el Río Blanco (V región, Chile). Química Nova. 32(9), 2417-2422.
- Araujo, J., Candeias-Mendes, A., Monteiro, I., Teixeira, D., Soares, F., Pousao-Ferreira, P. 2020. The use of diatom *Skeletonema costatum* on aquaculture-produced purple sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larvae and post-larvae diet. Aquaculture Research. 1, 1-10.
- Araya, R., Bahamondes, C., Barahona, K., Silva-Aciares, F. 2010. Utilización de una biopelícula microalgal multiespecífica para optimizar la fijación larval y el crecimiento de abalón (*Haliotis rufescens*) en un criadero comercial. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 45(1), 59-69.
- Austin, B., Austin, D., Sutherland, R., Thompson, F., Swings J. 2005. Pathogenicity of *Vibriosis* to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia* nauplii. Environmental Microbiology. 7(9), 1488-1495.
- Aullybux, A.A., Puchooa, D., Bahorun, T., Jeewon, R. 2019. Phylogenetics and antibacterial properties of exopolysaccharides from marine bacteria isolated from Mauritius seawater. Annals of Microbiology. 69, 967-972.
- Baker, N.R., Rosenqvist, E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. Journal of Experimental Botany. 55(403), 1607-1621.
- Bermúdez-Almada, M.C., Espinosa-Plascencia, A., Santiago-Hernández, M.L., Barajas-Borgo, C.J., Acedo-Félix, E. 2014. Comportamiento de oxitetraciclina en camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei* y la sensibilidad a tres antibióticos de bacterias *Vibrio* aisladas de los organismos. Biotecnia. 16(3), 29-37.
- Bertolleti-Barros, L., May de Mio, L.L., Biasi, L.A., Di Profio, F., Reynolds, A.G. 2014. Use of HPLC for characterization of sugar and phenolic compounds in *Vitis labrusca* juice. IDESIA (Chile). 32(2), 89-94.
- Bhagavathy, S., Sumathi, P., Bell, J.S. 2011. Green algae *Chlorococcum humicola* – a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 1, 51-57.

- Bjelland, A.M., Johansen, R., Brudal, E., Hansen, H., Winther-Larsen, H.C., Sørum, H. *Vibrio salmonicida* pathogenesis analyzed by experimental challenge of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Microbial Pathogenesis*. 52, 77-84.
- Blanco, M.M., Liébana, P., Gibello, A., Alcalá, C., Fernández-Garayzábal, J.F., Domínguez, L. 2004. Principales patologías bacterianas en la piscicultura española. *RedVet*. 1695-7504.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37, 911-917.
- Borić, M., Davnečič, T., Stopar, D. 2011. Prodigiosin from *Vibrio* sp. DSM 14379; A new UV-protective pigment. *Microbial Ecology*. 62, 528-536.
- Borowitzka, M.A. 2018. The 'stress' concept in microalgal biology-homeostasis, acclimation and adaptation. *Journal of Applied Phycology*. 1, 1-11.
- Bortolini-Rosales, J.L., Torres-García, M.P. 2004. La camaronicultura en México. *Ciencias*. 76, 58-61.
- Burak, H., Dunbar, A., Gilmour, D.J. 2019. Enhancement of *Dunaliella salina* growth by using wavelength shifting dyes. *Journal of Applied Phycology*. 31, 2791-2796.
- Calderón-Beltrán, I.C., Mora-Solarte, D.A., Velasco-Santamaría, Y.M. 2019. Respuestas fisiológicas y capacidad antioxidante de *Chlorella vulgaris* (Chlorellaceae) expuesta a fenantreno. *Acta Biológica Colombiana*. 25(2), 225-234.
- Capone, D., Weston, D., Miller, V., Shoemaker, C. 1996. Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. *Aquaculture*. 145, 55-75.
- Chantanachookin, C., Boonyaratpalin, S., Kasornchandra, J., Direkbusarakom, S., Ekpanithanpong, U., Supamataya, K., Sriurairatana, K., Flegel, T.W. 1993. Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. *Diseases of Aquatic Organisms*. 17, 145-157.
- Chatterjee, S., Haldar, S. 2012. *Vibrio* related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. *Journal Marine Science Research and Development*. 1, 1-7.
- Chávez-Domínguez, B. 2018. Uso responsable de antibióticos en acuicultura. En: Foro Internacional de Alimentos Sanos. San Luís Potosí. 30 de mayo de 2018. Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora.
- Cordero, H., Esteban, M.A., Cuesta, A. 2014. Use of probiotics bacteria against bacterial and viral infections in shellfish and fish aquaculture. *Sustainable Aquaculture Techniques*. 3, 239-265.

- Coutteau, P., Goossens, T. 2014. Feed additives based on quorum sensing disruption could aid fight against EMS. *Aquaculture Advocate*. 1, 1-5.
- Cucco, M., Guasco, B., Malacarne, G., Ottonelli, R. 2007. Effects of beta-carotene on adult immune condition and antibacterial activity in the eggs of the grey partridge, *Perdix perdix*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 147(4), 1038-1046.
- Cutignano, A., d'Ipolito, G., Romano, G., Lamari, D. Cimino, G., Febbraio, F., Nucci, R., Fontana, A. 2007. Chloroplastic glycolipids fuel aldehyde biosynthesis in the marine diatom *Thalassiosira rotula*. *ChemBioChem*. 7,450-456.
- Defoirdt, T., Sorgeloos, P., Bossier, P. 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Open in Microbiology*. 14, 251-258.
- Desbois, A.P., Mearns-Spragg, A., Smith, V.J. 2009. A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricorutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Marine Biotechnology*. 11, 45-52.
- Desbois, A.P., Smith, V.J. 2009. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85, 1629-1642.
- Durlu-Özkaya, F., Aslim, B., Ozkaya, M.T. 2007. Effect of exopolysaccharides (EPSs) produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains to bacteriophage and nisin sensitivity of the bacteria. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 1, 564-568.
- Egan, E.S., Waldor, M.K. 2003. Distinct replication requirements for the *Vibrio cholerae* chromosomes. *Cell*. 114, 521-530.
- Eilers, P.H.C., Peeters, J.C.H. 1988. A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecological Modelling*. 42(3-4), 199-215.
- Falaise, C., Francois, C., Travers, M.A., Morga, B., Haure, J., Tremblay, R., Turcotte, F., Pasetto, P., Gastineau, R., Hardivillier, Y., Leignel, V., Mouget, J.L. 2016. Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. *Marine Drugs*. 14(159), 1-27.
- FAO. 2007. Aquaculture development. Use of wild fish as feed in aquaculture. Roma, 2007.
- FAO. 2011. Manual básico de sanidad piscícola. Paraguay, 2011.
- FAO, 2017. Major bacterial diseases affecting aquaculture. Mangalore, India. 2017.
- FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma, 2020.

- Fimbres-Olivarría, D., López-Elías, Martínez-Córdova, L.R., Carvajal-Millán, F., Enríquez-Ocaña, F., Váldez-Olguín, E., Miranda-Baeza, A. 2014. Growth and biochemical composition of *Navicula* sp. cultivated at two intensities and three wavelengths. *The Israeli Journal of Aquaculture*. 67, 1-7.
- Flegel, T.W. 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*. 110(2), 166-173.
- Fogg, G.E., Thake, B.J. 1987. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. University of Wisconsin Press, London. 269 pp.
- Folch, J., Lee, M., Sloane-Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *The Journal of Biological Chemistry*. 22, 477-509.
- Garzón-Zúñiga, M.A., Buelna, G., Moeller-Chávez, G.E. 2012. La biofiltración sobre materiales orgánicos, nueva tecnología sustentable para tratar agua residual en pequeñas comunidades e industrias. *Tecnología y Ciencias del Agua*. 3, 153-161.
- Girón-Matute, W.I. 2008. Antimicrobianos. *Revista Facultad de Ciencias Médicas*. 1, 71-77.
- González-Davis, O., Ponce-Rivas, E., Sánchez-Saavedra, M.P., Muñoz-Márquez, E., Gerwick, W. 2012. Bioprospection of microalgae and cyanobacteria as biocontrol agents against *Vibrio campbellii* and their use in white shrimp *Litopenaeus vannamei* culture. *Journal of the World Aquaculture Society*. 43(3), 387-399.
- Gopal, S., Otta, S.K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M., Karunasagar, I. 2004. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 102, 151-159.
- Gregor, J., Marsálek, B. 2004. Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of *In vitro*, *In vivo* and *in situ* methods. *Water Research*. 38, 517-522.
- Guillard, R.L. y Rhyter, J.H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal Microbiology*. 8, 229-239.
- Haldar, S., Chatterjee, S., Sugimoto, N., Das, S., Chowdhury, N., Hinenoya, A., Asakura, M., Yamasaki, S. 2011. Identification of *Vibrio campbellii* isolated from diseased farm-shrimps from South India and establishment of its pathogenic potential in an *Artemia* model. *Microbiology*. 157, 179-188.
- Hernández-Pérez, A., Labbé, J.I. 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 49(2), 157-173.

- Holmström, K., Gräslund, S., Wahlström, A., Pongshompoo, S., Bengtsson B.E., Kautsky, N. 2003. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *Journal Food Science and Technology*. 38, 255-266.
- Huang, B., Tan, C., Chang, S.F., Munday, B., Mathew, J.A., Ngoh, G.H., Kwang, J. 2001. Detection of nodavirus in barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), using recombinant coat protein-based ELISA and RT-PCR. *Journal of Fish Diseases*. 24, 135-141.
- Huang, C.B., Alimova, Y., Myers, T.M., Ebersole, J.L. 2011. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Archives of Oral Biology*. 1, 650-654.
- Ibarra-Gómez, J.C., Galaviz-Silva, L., Molina-Garza, Z.J. 2007. Distribución de la bacteria causante de la necrosis hepatopancreática (NHPB) en cultivos de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, en México. *Ciencias Marinas*. 33(1), 1-9.
- Ina-Salwany, M.Y., Al-saari, N., Mohamad, A., Fathin-Amirah, M., Amal, M.N., Kasai, I., Mino, S., Sawabe, T., Zamri-Saad, M. 2018. *Vibriosis* in fish: a review on disease development and prevention. *Journal of Aquatic Animal Health*. 1-43.
- Irazaoki, O., Campoy, S., Barbé, J. 2017. The transient multidrug resistance phenotype of *Salmonella enterica* swarming cells is abolished by sub-inhibitory concentrations of antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*. 8, 1-10.
- Jatuyosporn, T., Laohawutthichai, P., Supungul, P., Sotelo-Mundo, R.R., Ochoa-Leyva, A., Tassanakajon, A., Krusong, K. 2019. Role of clathrin assembly protein-2 beta subunit during white spot syndrome virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Scientific Reports*. 9, 1-14.
- Jeffrey, S.W., Humphrey, G.F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, e, and c in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemistry Physiology Pflanzen*. 167, 191-194.
- Jiménez-Suanca, S.C., Alvarado, O.H., Balaguera-López, H.E. 2015. Fluorescence as an indicator of stress in *Helianthus annuus* L. A review. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 9(1), 149-160.
- Jiménez-Valera S., Sánchez-Saavedra, M.P. 2016. Growth and fatty acid profiles of microalgae species isolated from the Baja California Península México. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(4), 689-702.
- Jin-Hyung, L., Yong-Guy, K., Moo, H.C., Jintae, L. 2014. ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. *Microbiological Research*. 169(12), 888-896.

- Jüttner, F. 2001. Liberation of 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentanoic acid and other polyunsaturated fatty acids from lipids as a grazer defense reaction in epilithic diatoms biofilms. *Journal of Phycology*. 37, 744-755.
- Kariminik, A., Majid, B.S., Kheirkhah, B. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulates immune responses: an updated review article. *Immunology Letters*. 1, 1-23.
- Kuczynska, P., Jemiola-Rzeminksa, M., Strzalka, K. 2015. Photosynthetic pigments in diatoms. *Marine Drugs*. 13, 5847-5881.
- Lampe, M.F., Ballweber, L.M., Isaacs, C.E., Patton, D.L., Stamm, W.E. 1998. Killing of *Chlamydia trachomatis* by novel antimicrobial lipids adapted from compounds in human breast milk. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42(5), 1239-1244.
- Lauritano, C., Martín, J., de la Cruz, M., Reyes, F., Romano, G., Ianora, A. 2018. First identification of marine diatoms with anti-tuberculosis activity. *Scientific Reports*. 8(2284), 1-10.
- Leal, S., Medina, M.A., Guerrero, M.A., Piña, P., Nieves, M., Curbelo, R. 2013. Concentración y composiciones orgánica y proximal de dos especies de diatomeas bentónicas a diferentes salinidades. *Universidad y Ciencia*. 29(1), 15-52.
- Leone, G., De la Cruz-Valbuena, G., Cicco, S.R., Vona, D., Altamura, E., Ragni, R., Molotokaite, E., Cecchin, M., Cazzaniga, S., Ballotari, M., D'Andrea, C., Lanzani, G., Farinola, G.M. 2021. Incorporating a molecular antenna in diatom microalgae cells enhances photosynthesis. *Nature*. 11, 1-12.
- Leung, H.P., Zhao, S., Ho, K.P., Wu, J.Y. 2009. Chemical properties and antioxidant activity of exopolysaccharides from mycelial culture of *Cordyceps sinensis* fungus Cs-HK1. *Food Chemistry*. 114(4), 1251-1256.
- Li, D., Zhang, H., Fu, L., An, X., Zhang, B., Li, Y., Chen, Z., Zheng, W., Yi, L. 2014. A novel algicide: evidence of the effect of a fatty acid compound from the marine bacterium, *Vibrio* sp. BS02 on the harmful dinoflagellate, *Alexandrium tamarense*. *Plos One*. 9(3), 1.13.
- Li, P., Kinch, L.N., Ray, A., Ankur, D., Qian, C., Andrew, C., Nick, G., Dor, S., Orth, K. 2017. Acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus* strains maintain an antibacterial type VI secretion system with versatile effector repertoires. *Applied and Environmental Microbiology*. 83(13), 1-17.
- Liu, L., Ponhert, G., Wei, D. 2016. Extracellular metabolites from industrial microalgae and their biotechnological potential. *Marine Drugs*. 14(191), 1-19.

- Liu, P.C., Lin J.Y., Hsiao, P.T., Lee, K.K. 2004. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased cobia *Rachycentron canadum*. *Journal of Basic Microbiology*. 44, 23-28.
- Long-Uong, W., Jiann-Chu, Chen. 2005. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. *Fish and Shellfish Immunology*. 18(4), 269-278.
- Lowry, O.H., Rosebrugh, H.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265-275.
- Marquina-Diaz, D., Santos-de la Sen, A. 2010. Procesos biológicos regulados por quorum sensing. *Reduca (Biología)*. 3(5), 56-74.
- Martínez-Córdova, L.R., Martínez-Porchas, M., Cortés-Jacinto, E. 2009. Camaronicultura mexicana y mundial: ¿Actividad sustentable o industria contaminante?. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 25(3), 181-196.
- Matsue, M., Mori, Y., Nagase, S., Sugiyama, Y., Hirano, R., Ogai, K., Ogura, K., Kurihara, S., Okamoto, S. 2019. Measuring the antimicrobial activity of lauric acid against various bacteria in human gut microbiota using a new method. *Cell Transplantation*. 28(12), 1228-1541.
- Metcalf, L. D., Schmitz, A. A., Pelka, J. R. 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*. 38, 514-515.
- Milton, D.L. 2006. Quorum sensing in *Vibrios*: Complexity for diversification. *International Journal of Medical Microbiology*. 296, 61-71.
- Miranda, C.D., Godoy, F.A., Lee, M.R. 2018. Current status of the use of antibiotics and the antimicrobial resistance in the Chilean salmon farms. *Frontiers in Microbiology*. 9, 1-14.
- Mirzoeva, O.K., Grishanin, R.N., Calder, P.C. 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbial Research*. 152(3), 239-246.
- Molina-Cárdenas, C.A. 2011. Efecto inhibitorio de diferentes especies de microalgas sobre *Vibrio* spp. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 81 pp.
- Molina-Cárdenas, C.A., Sánchez-Saavedra, M.P., Lizárraga-Partida, M.L. 2014. Inhibition of pathogenic *Vibrio* by the microalgae *Isochrysis galbana*. *Journal of Applied Phycology*. 1, 1-9.
- Molina-Cárdenas, C.A., Sánchez-Saavedra, M.P. 2017. Inhibitory effect of benthic diatoms species on three aquaculture pathogenic *Vibrios*. *Algal Research*. 27, 131-139.

- Molina-Cárdenas, C.A., Licea-Navarro, A., Sánchez-Saavedra, M.P. 2020. Effects of *Vibrio cholerae* on fatty acid profiles in *Isochrysis galbana*. *Algal Research*. 46, 1-6.
- Muller-Feuga, A. 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology*. 12(3-5), 527-534.
- Mysliwa-Kurdziel, B., Latowski, D., Strzalska, K. 2019. Chlorophylls c-occurrence, synthesis, properties, photosynthetic, and evolutionary significance. *Advances in Botanical Research*. 90, 91-119.
- Najdenski, H.M., Gigova, L.G., Iliev, I.I., Pilarski, P.S., Lukavsky, J., Tsvetkova, I.V., Ninova, M.S., Kussovski, V.K. 2013. Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. *International Journal of Food Science & Technology*. 48, 1533-1540.
- Nakai, T., Park, S.C. 2001. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Research in Microbiology*. 153, 13-18.
- Natrah, F.M.I., Bossier, P., Sorgeloos, P., Yusoff, F., Defoirdt, T. 2014. Significance of microalgal-bacterial interactions for aquaculture. *Reviews in Aquaculture*. 5, 1-14.
- Natrah, F.M.I., Kenmegne, M.M., Wiyoto, W., Sorgeloos, P., Bossier, P., Defoirdt T. 2011. Effects of micro-algae commonly used in aquaculture on acyl-homoserine lactone quorum sensing. 317 (1-4), 53-57.
- Naviner, M., Bergé, J.P., Durand, P., Bris, H.L. 1999. Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. *Aquaculture Research*. 174, 15-24.
- Nehal, F., Sahnoun, M., Smaoui, S., Jaouadi, B., Bejar, S., Mohammed, S. 2019. Characterization, high production and antimicrobial activity of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* F-mou. *Microbial Pathogenesis*. 132, 10-19.
- Norma Oficial Mexicana NOM-EM-05-PESC-2002, que establece los requisitos y medidas para prevenir y controlar la dispersión de enfermedades de alto impacto y para el uso y aplicación de antibióticos en la camaronicultura nacional. Publicada en el diario oficial de la federación el 19 de Julio de 2002. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México, D.F. 5 pp.
- Nwodo, U.U., Green, E., Okoh, A.I. 2012. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *International Journal of Molecular sciences*. 13(11), 14002-14015.
- Okolodkov, Y.B., Huerta-Quintanilla, D.A. 2018. Diatomeas bentónicas marinas. *Materia, Ciencia y Nanociencia*, 1(2), 13-27.

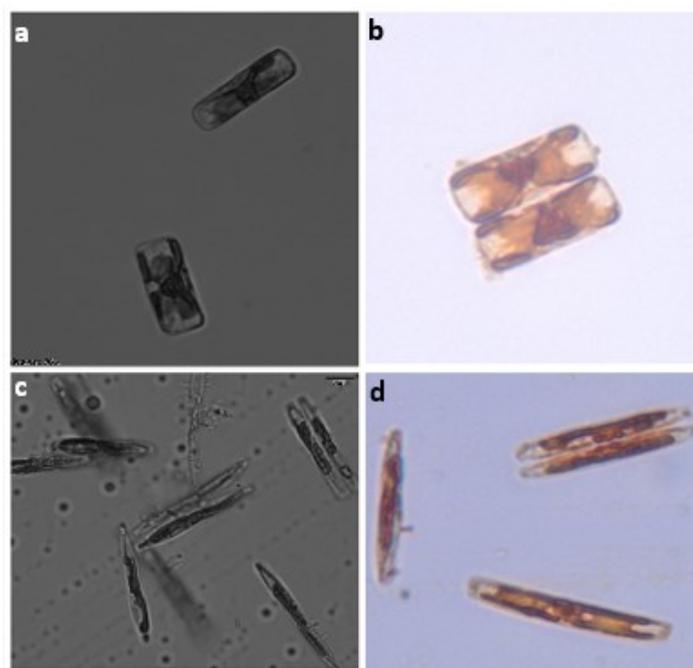
- Okunowo, W.O., Oyejedi, A.O., Ilesanmi, J.A., Afolabi, L.O., Umunnakwe, I.E. 2018. Antimicrobial, antioxidant potential and chemical composition of the methanolic extracts of *Spirogyra setiformis* and *Navicula* species. *Journal of Scientific Research and Development*, 17(1), 15-20.
- Oppenheimer, C.H., Zobell, C.E. 1952. The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *Journal of Marine Research*. 11, 10-18.
- Ozturk, S., Aslim, B. 2010. Modification of exopolysaccharide composition and production by three cyanobacterial isolates under salt stress. *Environmental Science and Pollution Research*. 17, 595-602.
- Pande, S.V., Khan, R.P., Venkitasubramanian, T.A. 1963. Microdetermination of lipids and serum total acids. *Analytical Biochemistry*. 6, 415-423.
- Park, S.C., Shimamura, I., Fukunaga, M., Mori, K.I., Nakai, T. 2000. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(4), 1616-1422.
- Parsons, T.R. Matia, Y., Lalli, C.M. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, Oxford. 101-106 pp.
- Patel, A., Prajapati, J.B. 2013. Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Advances in Dairy Research*, 1(2), 1-7.
- Perera, I.A., Abinandan, S., Subashchandrabose, S.R., Venkateswarlu, K., Naidu, R., Megharaj, M. 2021. Microalgal-bacterial consortia unveil distinct physiological changes to facilitate growth of microalgae. *Microbiology Ecology*. 97(3), 1-13.
- Platas-Rosado, D.E., Vilaboa-Arroniz, J.A. 2014. Mexican aquaculture sector: Prospective, opportunities and challenges. *Revista Mexicana de Agronegocios*. 35, 1065-1071.
- Pradhan, J., Das, S., Das, B.K. 2014. Antibacterial activity of freshwater microalgae: a review. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 8(32), 809-818.
- Praja, R.K., Safnurbaiti, D.P. 2018. The infection of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp and human. *Oceana Biomedicina Journal*. 1, 44-58.
- Ramírez, E.E., González, M.A., Cifuentes, A.S., Inostroza, I., Urrutia, R.E. 2015. Culture and growth of two benthic diatoms species isolated from the Salar del Huasco (North of Chile, 20° S) at different conditions of temperature, light and nutrients. *Gayana Botánica*. 72(2): 165-176.
- Richard, D., Kefi, K., Barbe, U., Bausero, P., Visioli, F. 2008. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharmacology Research*. 57(6), 451-455.

- Rodríguez-Nuñez, K., Toledo-Agüero, P. 2017. Fatty acids profile and nutritional composition of two tropical diatoms from the Costa Rican Pacific Coast. *Grasas y Aceites*. 68(3), 1.8.
- Roque, A., Molina-Aja, A., Bolán-Mejía, C., Gómez-Gil, B. 2001. In vitro susceptibility to 15 antibiotics of *Vibrios* isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 17, 383-387.
- Rueda-González, F.M. 2011. Breve historia de una gran desconocida: La acuicultura. *Revista Eubacteria*. 26, 1-2.
- Ruwandeeepika, H.A., Defoirdt, T., Bhowmick, P.P., Shekar, M., Bossier, P., Karunasagar, I. 2010. Presence of typical and atypical virulence genes in *Vibrio* isolates belonging to the harveyi clade. *Journal of Applied Microbiology*. 109, 888-899.
- Sadava, D., Heller, G., Orians, G., Purves, W., Hillis, D. 2008. *Vida, la ciencia de la biología*. Octava edición. Panamericana, Buenos Aires, Argentina. 323 pp.
- Sánchez-Saavedra, M.P., Licea-Navarro, A., Bernáldez-Sarabia, J. 2010. Evaluation of the antibacterial activity of different species of phytoplankton. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 45(3), 531-536.
- Sandaa, R.A., Bratbak, G. 2018. Is the virus important? And some other questions?. *Viruses*. 10 (442), 1-4.
- Santiago, M.L., Espinoza, A., Bermúdez, M.C. 2009. Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 40(3), 22-32.
- Sarthou, G., Timmermans, K.R., Blain, S., Tréguer, P. 2005. Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review. *Journal of Sea Research*. 53, 25-42.
- Schar, D., Klein, E., Laxminarayan, R., Gilbert, M., Van Boeckel, T.P. 2020. Global trends in antimicrobial use in aquaculture. *Nature Research*. 10, 1-9.
- Scholz, B. 2014. Effects of varying pH on the growth and physiology of five marine microphytobenthic diatoms isolated from the Solthorn tidal flat (southern North Sea, Germany). *Phycologia*. 53(3), 252-264.
- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Ramakrishnan, M., Singh-Sidhu, G.P., Bali, A.S., Handa, N., Kapoor, D., Yadav, P., Khanna, K., Bakshi, P., Rehman, A., Kohli, S.K., Khan, E.A., Parihar, R.D., Yuan, H., Thukral, A.K., Bhardwaj, R., Zheng, B. 2019. Photosynthetic response of plants under different abiotic stresses: a review. *Journal of Plant Growth Regulation*. 1, 1-23.

- Segundo, N., Hernández, B., López, O., Torres, O. 2010. Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 41(3), 17-26.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. En: J. Stein (Ed.), *Handbook of Phycological Methods. Culture methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press. pp. 321-344.
- Sushchik, N.N., Kalacheva, G.S., Gladyshev, M.I. 2001. Secretion of free acids by prokaryotic and eukaryotic algae at optimal, supraoptimal, and suboptimal growth temperatures. *Microbiology*. 70(5), 542-547.
- Tamaru, C.S., Murashige, R., Lee, C.S. 1994. The paradox of using background phytoplankton during the larval culture of striped mullet, *Mugil cephalus* L. *Aquaculture*. 119, 167-174.
- Tamura, K., Shimada, S., Prescott, L.M. 1971. *Vibrio* agar: A new plating medium for isolation of *Vibrio cholerae*. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*. 24, 125-127.
- Tan, L., Xu, W., He, X., Wang, J. 2019. The feasibility of Fv/Fm on judging nutrient limitation of marine algae through indoor simulation and in situ experiment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 229, 1-8.
- Teoh, M.L., Chu, W.L., Marchant, H., Phang, S.M. 2004. Influence of culture temperature on the growth, biochemical composition, and fatty profile of six Antarctic microalgae. *Journal of Applied Phycology*. 16, 421-430.
- Thompson, F.L., Iida, T., Swings, J. 2004. Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(3), 403-431.
- Thorel, M., Fauchot, J., Morelle, J., Raimbault, V., Le Roy, B., Miossec, C., Kientz-Bouchart, V., Claquin, P. 2014. Interactive effects of irradiance and temperature on growth and domoic acid production of the toxic diatom *Pseudo-Nitzschia australis* (Bacillariophyceae). *Harmful Algae*. 39, 232-241.
- Tocher, D.R. 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*. 41, 717-732.
- Torres-Zarazaga, C. 2002. Antibióticos como promotores del crecimiento en animales. ¿Vamos por el buen camino?. *Gaceta Sanitaria*. 16(2), 109-112.
- Ullitzur, S. The mechanism of swarming of *Vibrio alginolyticus*. *Archives of Microbiology*. 104, 67-71.
- USDA. 2011. Bioseguridad y prevención de enfermedades en la acuicultura. Iowa, 2011.

- Venkateswara, R.A. 2015. *Vibriosis* in shrimp aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*. 3, 1-9.
- Vuong, T.T., Kwon, B.R., Eom, J.I., Shin, B.K., Kim, S.M. 2019. Interaction between marine bacterium *Stappia* sp. K01 and diatom *Phaeodactylum tricornutum* through extracellular fatty acids. *Journal of Applied Phycology*. 1, 1-12.
- Walker, P.J., Winton, J.R. 2010. Emerging viral diseases of fish and shrimp. *Veterinary Research*. 41, 1-24.
- Wang, L., Chen, Y., Huang, H., Huang, Z., Chen, H., Shao, Z. 2015. Isolation and identification of *Vibrio campbellii* as a bacterial pathogen for luminous *Vibriosis* of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*. 46, 395-404.
- Whyte, N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*. 60, 321-241.
- Winzer, K., Williams, P. 2001. Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*. 2, 131-143.
- Wu, J., Zhang, Y., Ye, L., Wang, C. 2020. The anti-cancer effects and mechanisms of lactic acid bacteria exopolysaccharides in vitro: A review. *Carbohydrate polymers*. 7, 1-56.
- Xiao-Man, S., Lu-Jing, R., Quan-Yu, Zhao., Xiao-Jun, J., He, H. 2018. Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnology for Biofuels*. 11, 1-16.
- Yamaichi, Y., Duigou, S., Shakhnovich, E.A., Waldor, M.K. 2009. Targeting the replication initiator of the second *Vibrio* chromosome: towards generation of *Vibrionaceae*-specific antimicrobial agents. *PLoS Pathology*. 5, 26-33.
- Yoshinaga, I., Kawai, T., Ishida, Y. 1995. Lysis of *Gimnodinium nagasakiense* by marine bacteria. En: Lassus, P., Arzul, G., Marcaillou, C. (eds). *Harmful marine algal blooms*. 687-693.
- Zarain-Herzberg, M., Ascencio-Valle, F. 2001. Taurasíndrome in México: follow-up study in shrimp farms of Sinaloa. *Aquaculture*. 193, 1-9.
- Zhang, X.H., Austin, B. 2000. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *Journal of Fish Diseases*. 23, 93-102.

Anexos



Figurta 42. Imágenes de las diatomeas empleadas en este estudio. Paneles a-b corresponden a la diatomea *Navicula* cf. *subinflatoides*; paneles c-d corresponden a *Nitzschia thermalis* f. *kurta*. Imágenes tomadas por Molina-Cárdenas, (2021).

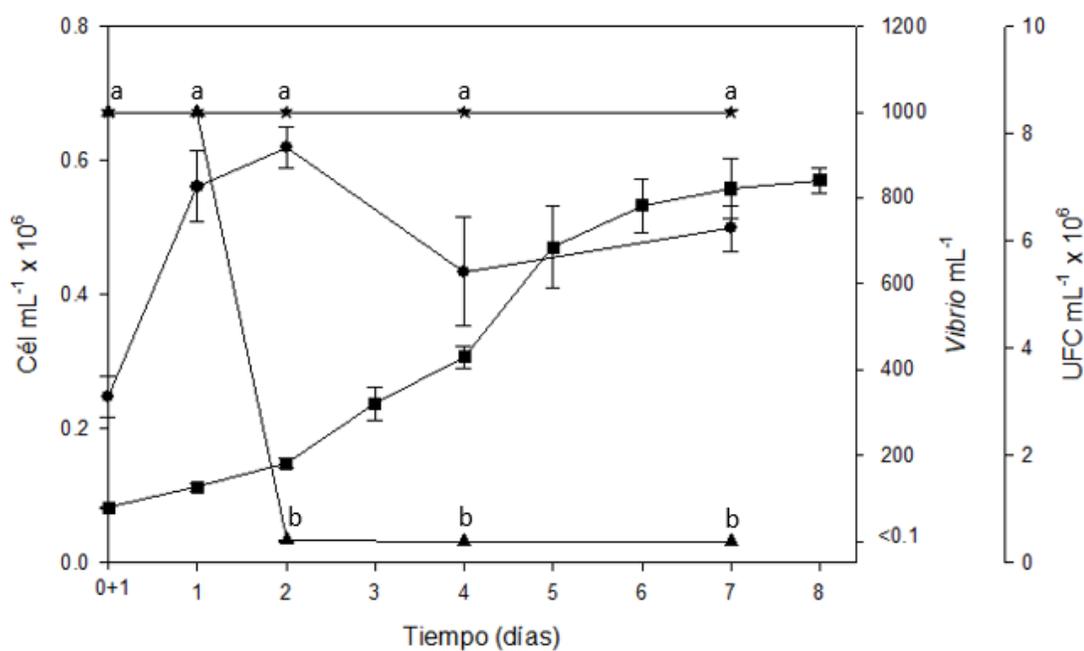


Figura 43. Reto de inhibición de *Navicula subinflatoides* contra *Vibrio harveyi*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: *V. harveyi* (Vibrio mL⁻¹: (▲), *V. harveyi* en tratamiento control (Vibrio mL⁻¹: (★) y bacterias heterotróficas (UFC mL⁻¹) (●) cocultivadas con *N. subinflatoides* (cél mL) (■)). Filtrado de 1 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b.

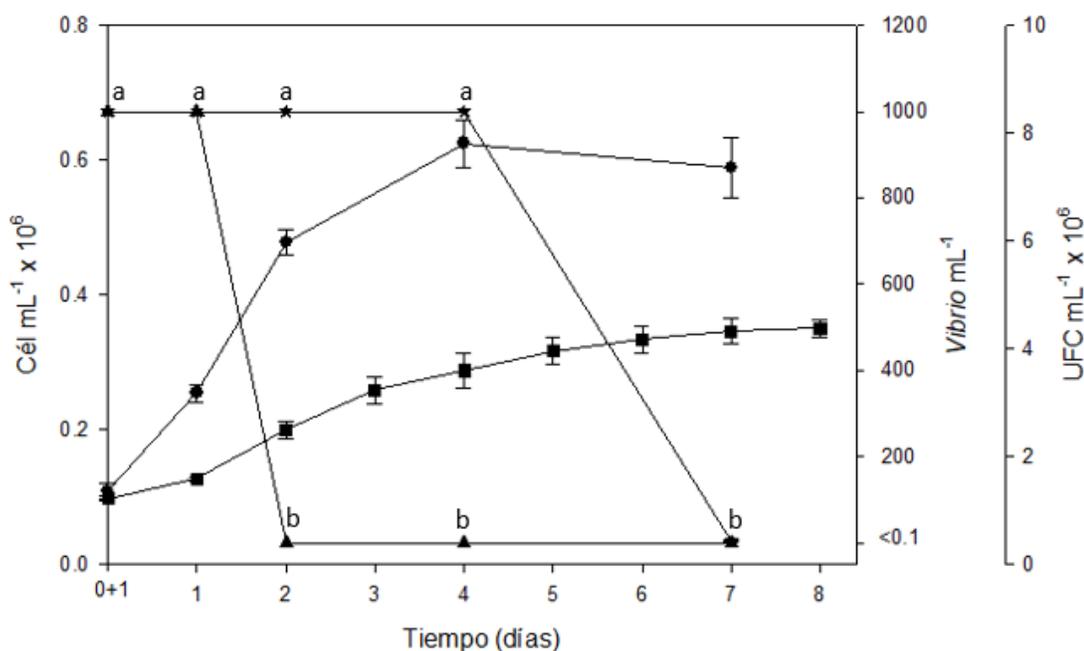


Figura 44. Reto de inhibición de *Navicula subinflatooides* contra *Vibrio alginolyticus*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: *V. alginolyticus* ($Vibrio\ mL^{-1}$: (▲), *V. alginolyticus* en tratamiento control ($Vibrio\ mL^{-1}$: (★) y bacterias heterotróficas (UFC mL^{-1}) (●) cocultivadas con *N. subinflatooides* (cél mL^{-1}) (■)). Filtrado de 1 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b.

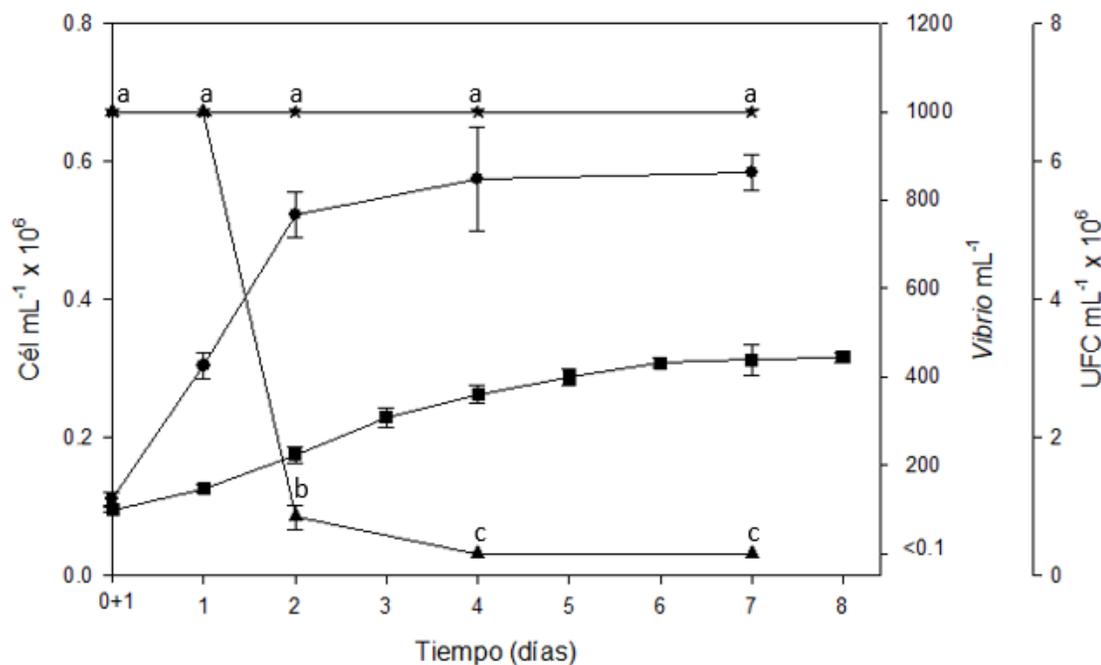


Figura 45. Reto de inhibición de *Navicula subinflatooides* contra *Vibrio campbellii*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: *V. campbellii* ($Vibrio\ mL^{-1}$: (▲), *V. campbellii* en tratamiento control ($Vibrio\ mL^{-1}$: (★) y bacterias heterotróficas (UFC mL^{-1}) (●) cocultivadas con *N. subinflatooides* (cél mL^{-1}) (■)). Filtrado de 1 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b>c.

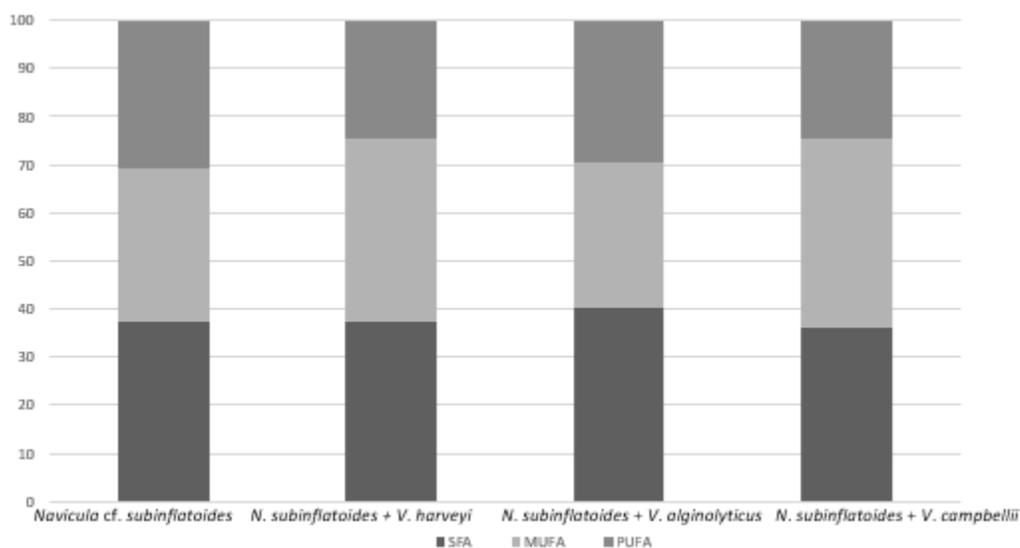


Figura 46. Composición de ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de *Navicula subinflatooides* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp.

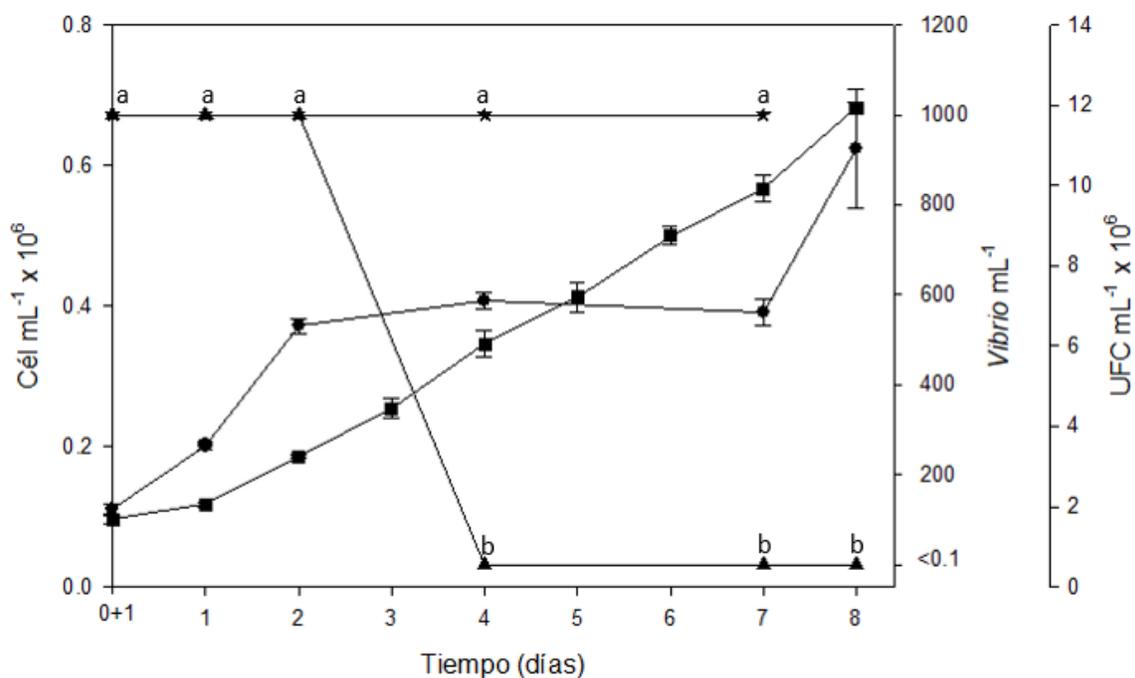


Figura 47. Reto de inhibición de *Nitzschia thermalis* contra *V. harveyi*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: *V. harveyi* ($Vibrio\ mL^{-1}$: (▲), *V. harveyi* en tratamiento control ($Vibrio\ mL^{-1}$: (★) y bacterias heterótrofas ($UFC\ mL^{-1}$) (●) cocultivadas con *N. thermalis* (cél mL^{-1}) (■)). Filtrado de 1 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b.

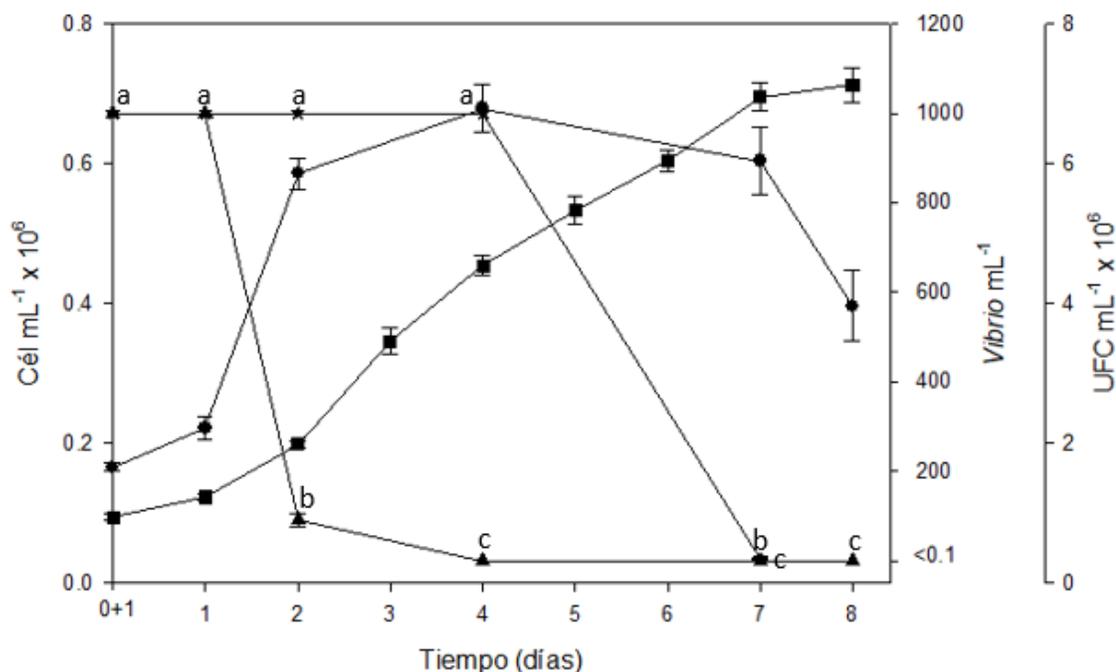


Figura 48. Reto de inhibición de *Nitzschia thermalis* contra *V. alginolyticus*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: *V. alginolyticus* (Vibrio mL^{-1} : (▲), *V. alginolyticus* en tratamiento control (Vibrio mL^{-1} : (★) y bacterias heterotróficas (UFC mL^{-1}) (●) cocultivadas con *N. thermalis* (cél mL^{-1}) (■)). Filtrado de 1 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: $a>b>c$.

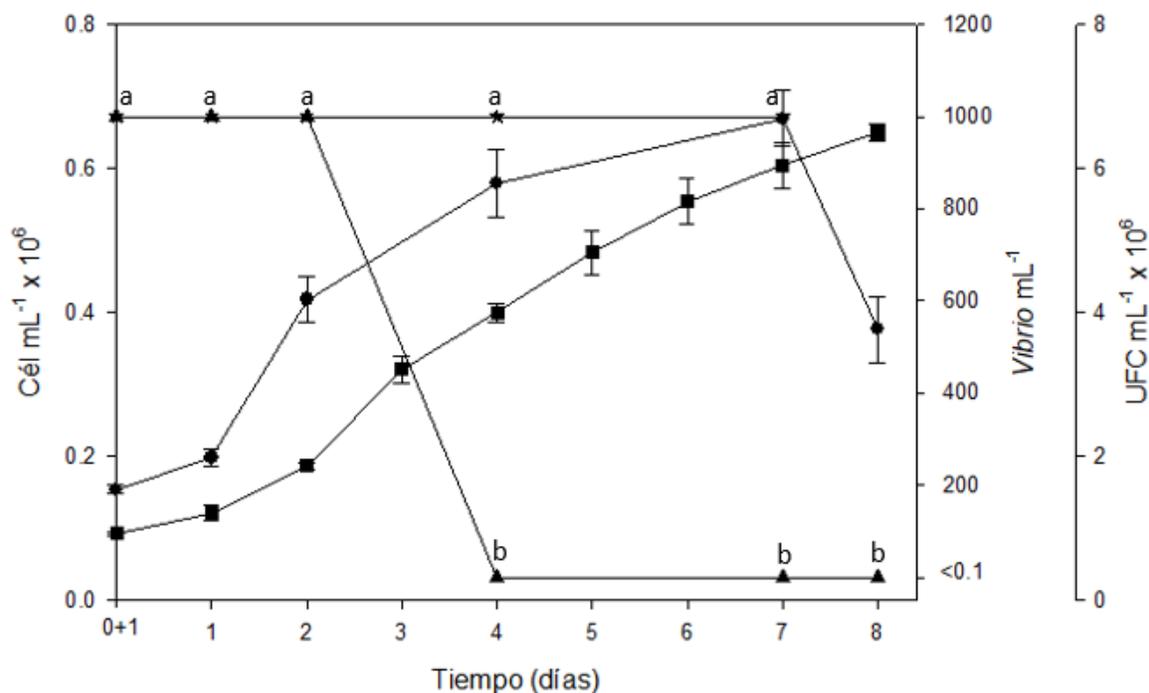


Figura 49. Reto de inhibición de *Nitzschia thermalis* contra *V. campbellii*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: *V. campbellii* (Vibrio mL^{-1} : (▲), *V. campbellii* en tratamiento control (Vibrio mL^{-1} : (★) y bacterias heterotróficas (UFC mL^{-1}) (●) cocultivadas con *N. thermalis* (cél mL^{-1}) (■)). Filtrado de 1 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: $a>b$.

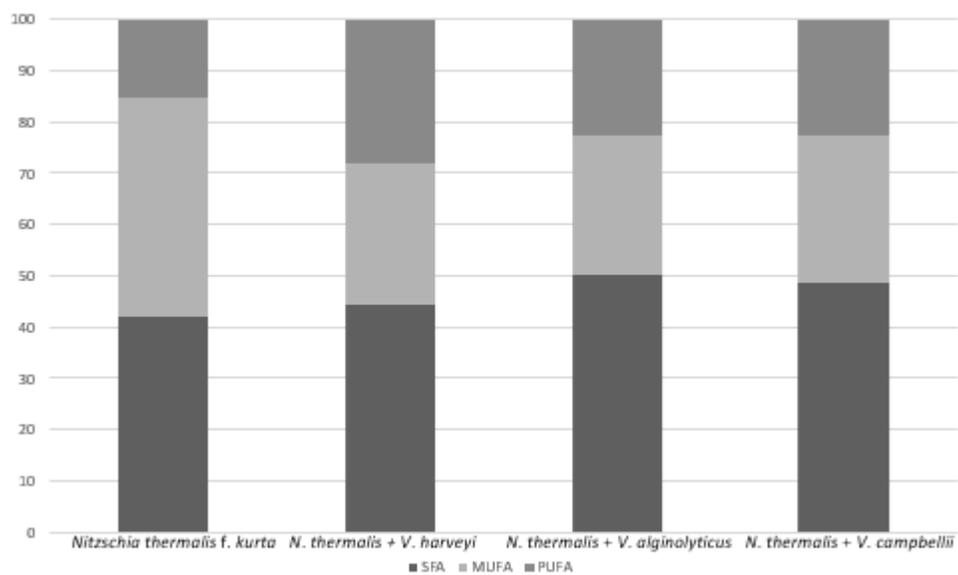


Figura 50. Composición de ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de *Nitzschia thermalis* en presencia o ausencia de *Vibrio* spp.