

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2022. Todos los derechos reservados

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



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Actividad del exopolisacárido sulfatado producido por la
microalga *Porphyridium cruentum* sobre las bacterias *Vibrio
harveyi* y *Escherichia coli***

Tesis

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

Presenta:

Ramiro Hernández García

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
Ramiro Hernández García

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Codirectora de tesis

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Codirector de tesis

Dr. Roberto Cruz Flores

Dr. Misael Rosales Leija

Dra. Elizabeth Ponce Rivas

Dr. Samuel Sánchez Serrano



Dr. Roberto Cruz Flores
Coordinador del Posgrado en acuicultura

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Ramiro Hernández García** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Actividad del exopolisacárido sulfatado producido por la microalga *Porphyridium cruentum* sobre las bacterias *Vibrio harveyi* y *Escherichia coli*

Resumen aprobado por:

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Codirectora de tesis

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Codirector de tesis

La acuicultura es una actividad enfocada a la producción de alimentos que ha mantenido un crecimiento constante en las últimas décadas. Sin embargo, esta actividad se ha visto afectada por brotes de enfermedades infecciosas que merman su producción. La bacteria *Vibrio harveyi* es uno de los agentes infecciosos que más ha afectado a esta actividad, y como es ya sabido, el uso de antibióticos es cada vez más cuestionado, ya que su mal uso favorece la resistencia bacteriana. En el presente trabajo se estudió la aplicación del exopolisacárido sulfatado (EPS) producido por la microalga *Porphyridium cruentum*, para el posible control de la bacteria *V. harveyi*. Para tal efecto, se realizó un cultivo de *P. cruentum* y se llevaron a cabo extracciones de EPS de las distintas fases de crecimiento del alga. El EPS colectado fue preparado en concentraciones de 0.05, 0.1 y 0.2 mg ml⁻¹ para las pruebas de actividad antimicrobiana. Se realizaron cultivos de las bacterias *V. harveyi* y *Escherichia coli* (bacteria modelo) y de estas se obtuvieron concentraciones de 1.5x10⁸ UFC ml⁻¹ de las fases de crecimiento exponencial (FCE) que fueron inoculadas en medio Mueller Hinton para realizar las pruebas de sensibilidad. Los resultados indican que el EPS no generó inhibición en ninguna de las especies bacterianas en las concentraciones ensayadas. Las causas por las cuales se observaron estos resultados pueden deberse a que el EPS no presenta las propiedades bioquímicas necesarias para generar una inhibición de crecimiento en ambas bacterias o que algún problema metodológico impidió corroborar dicho efecto. Además, no hay diferencia estadística en la producción de EPS (promedio: 2.84 ± 0.14 mg ml⁻¹) en las distintas fases de crecimiento; sin embargo, el contenido de azúcares de glucosa, xilosa y galactosa del EPS aumentó en la FCE, esto indica que el contenido de estos azúcares está relacionado a la fase de crecimiento de *P. cruentum*. Adicionalmente, se obtuvo que el EPS no presenta una diferencia estadística en contenido de sulfatos, Así que, el contenido de sulfatos no depende de la fase de crecimiento en la que se encuentre el alga, ni del contenido de los azúcares.

Palabras clave: *Porphyridium cruentum*, polisacárido, *Vibrio harveyi*, *E. coli*

Abstract of the thesis presented by **Ramiro Hernández García** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

Activity of the exopolysaccharide produced by the microalgae *Porphyridium cruentum* on the bacteria *Vibrio harveyi* and *Escherichia coli*

Abstract approved by:

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Codirector of thesis

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Codirector of thesis

Aquaculture is an activity focused on food production that has maintained a constant growth in recent decades. However, this activity has been affected by outbreaks of infectious diseases that reduce its production. The bacterium *Vibrio harveyi* is one of the infectious agents that has most affected this activity, and as is already known, the use of antibiotics is increasingly questioned, since its misuse favors bacterial resistance. In the present work, the application of the sulfated exopolysaccharide (EPS) produced by the microalgae *Porphyridium cruentum* was studied, for the possible control of the bacterium *V. harveyi*. For this purpose, a culture of *P. cruentum* was carried out and EPS extractions were carried out from the different phases of algae growth. The collected EPS was prepared in concentrations of 0.05, 0.1 and 0.2 mg ml⁻¹ for antimicrobial activity testing. Cultures of the bacteria *V. harveyi* and *Escherichia coli* (model bacteria) were carried out and from these concentrations of 1.5x10⁸ CFU ml⁻¹ of the exponential growth phases were obtained and inoculated in Mueller Hinton medium to perform the sensitivity tests. The results indicate that EPS did not generate inhibition in any of the bacterial species at the concentrations tested. The reasons why these results were observed may be due to the fact that EPS does not have the biochemical properties necessary to generate a growth inhibition in both bacteria or that some methodological problem prevented corroborating this effect. In addition, there is no statistical difference in EPS production (average: 2.84 ± 0.14 mg ml⁻¹) in the different growth phases; however, the sugar content of glucose, xylose and galactose of EPS increased in exponential growth phases, this indicates that the content of these sugars is related to the growth phase of *P. cruentum*. Additionally, it was obtained that the EPS does not present a statistical difference in sulfate content, so the sulfate content does not depend on the growth phase in which the algae is located, nor on the content of the sugars.

Keywords: *Porphyridium cruentum*, polysaccharide, *Vibrio harveyi*, *E. coli*

Dedicatoria

*A mis padres Esther y Javier, a mis hermanos
Arnulfo y Rodolfo y mi tía Flora, por todo el apoyo
que me brindaron en muchos sentidos, este logro fue
gracias a ellos.*

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca que me permitió realizar mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada Baja California (CICESE), en especial al Departamento de Acuicultura y a su personal, por brindarme el apoyo y la orientación académica, por permitirme hacer uso de sus instalaciones.

A la Dra. Beatriz Cordero Esquivel y al Dr. Jorge Cáceres Martínez por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por compartir sus conocimientos conmigo y por brindarme su atención en los momentos que lo necesité.

A todos mis sinodales, el Dr. Roberto Cruz Flores, el Dr. Misael Rosales Leija, el Dr. Samuel Sánchez Serrano, a la Dra. Elizabeth Ponce Rivas les agradezco todas sus observaciones realizadas con el fin de hacer un mejor trabajo.

Al Dr. Enrique Hernández Garibay por su apoyo en la técnica de extracción del exopolisacárido y cuantificación de sulfatos. También le agradezco la donación de material para estos análisis.

A la Maestra en Ciencias Yanet Guerrero Rentería, técnico de laboratorio de biología y patología de organismos acuáticos del Departamento de Acuicultura, por el entrenamiento técnico en la preparación de medios de cultivo, análisis bacteriológicos y cotizaciones de reactivos de laboratorio.

Al Maestro en Ciencias Abelardo Campos Espinoza, técnico del laboratorio de microalgas del Departamento de Acuicultura, por siempre resolver mis dudas sobre el uso de equipo, sugerir metodologías que mejoraron la extracción de exopolisacárido y purificación del mismo. También, por enseñarme el proceso de liofilización.

A mis hermanos Arnulfo y Rodolfo quienes siempre están atentos de mis emociones y tener para mí siempre una sonrisa, un abrazo y un consejo, pero, sobre todo, les agradezco de todo corazón el que siempre creyeron en mí y en mis capacidades para lograr esta etapa de mi vida.

A mis padres, Esther y Javier, por estar siempre al pendiente de mí y darme el apoyo incondicional. A mi madre le agradezco que siempre tiene una palabra de aliento y consuelo y a mi padre quien me enseñó a ser un hombre responsable. Gracias a ellos pude concluir esta etapa de mi vida.

A mi tía Flora que me apoyó tanto emocionalmente como económicamente para mis estudios. Le agradezco que siempre yo esté en sus oraciones.

A mi novia Fernanda, quien me enseñó que hay un mundo por conocer, que me motivó a salir de mi zona de confort y, sobre todo, le agradezco que sea mi motor y mi luz para seguir corriendo en los caminos oscuros.

A mi compañero Rubén Luna que se abrió un espacio entre todas sus actividades para poderme apoyar en este trabajo.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	4
1.1.1 Microalgas y compuestos antimicrobianos.....	4
1.1.2 Bacterias del género <i>Vibrio</i>	6
1.2 Justificación	7
1.3 Hipótesis.....	8
1.4 Objetivos	8
1.4.1 Objetivo general.....	8
1.4.2 Objetivos específicos.....	9
Capítulo 2. Metodología.....	10
2.1 Cultivo de <i>Porphyridium cruentum</i>	10
2.1.1 Condiciones de cultivo	10
2.1.2 Recuento celular y tasa de crecimiento	10
2.1.3 Extracción de exopolisacárido sulfatado (EPS).....	11
2.1.4 Peso seco total (PST) y peso orgánico (PO) de EPS	12
2.1.5 Purificación del EPS	12
2.1.6 Análisis de sulfatos.....	12
2.1.7 Análisis de azúcares.....	13
2.2 Cultivo de la bacteria <i>Vibrio harveyi</i>	13
2.2.1 Reactivación de la bacteria <i>V. harveyi</i>	13
2.3 Curva de crecimiento de <i>Vibrio harveyi</i>	13
2.3.1 Curva de calibración del crecimiento de <i>V. harveyi</i>	14
2.4 Prueba de sensibilidad de la bacteria <i>V. harveyi</i> al EPS de <i>P. cruentum</i>	14
2.5 Prueba de sensibilidad de la bacteria <i>Escherichia coli</i> al EPS de <i>P. cruentum</i>	15

Capítulo 3. Resultados	16
3.1 Peso orgánico (PO) de <i>P. cruentum</i>	16
3.2 Exopolisacárido sulfatado (EPS) y sulfatos.....	17
3.3 Concentración de azúcares del exopolisacárido (EPS) de <i>P. cruentum</i>	19
3.4 Peso orgánico (PO) del EPS	20
3.5 Identificación de la bacteria <i>Vibrio harveyi</i>	21
3.5.1 Curva de crecimiento y calibración de la bacteria <i>Vibrio harveyi</i>	22
3.6 Curva de crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i>	23
3.7 Prueba de sensibilidad de las bacterias <i>V. harveyi</i> y <i>E. coli</i> al exopolisacárido sulfatado de <i>P. cruentum</i>	23
Capítulo 4. Discusión.....	25
Capítulo 5. Conclusiones	30
Capítulo 6. Recomendaciones	31
Literatura citada	32
Anexo	41

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Crecimiento de <i>Porphyridium cruentum</i> en cultivo estático.....	16
Figura 2. Peso orgánico (PO, $\mu\text{g ml}^{-1}$) de <i>Porphyridium cruentum</i> durante los diferentes días de muestreo del cultivo estático.....	17
Figura 3. Peso orgánico (pg cél^{-1}) de <i>Porphyridium cruentum</i> durante los diferentes días de muestreo.	17
Figura 4. Concentración (mg ml^{-1}) de exopolisacárido sulfatado producido por <i>P. cruentum</i> en cultivo estático.....	18
Figura 5. Concentración (%) de sulfatos en el exopolisacárido sulfatado (EPS) producido por <i>P. cruentum</i> en cultivo estático.....	18
Figura 6. Curva de calibración de sulfatos realizada con el reactivo K_2SO_4	19
Figura 7. Curvas de calibración de azúcares: (A) Glucosa, (B) Xilosa, (C) Galactosa	19
Figura 8. Concentración (%) de azúcares obtenidos en el exopolisacárido (EPS) de <i>P. cruentum</i> . Glucosa (Glu), Xilosa (Xil) y Galactosa (Gal).	20
Figura 9. Peso orgánico (PO, %) del exopolisacárido sulfato (EPS) producido por <i>P. cruentum</i> en diferentes días de muestreo durante el cultivo estático.	21
Figura 10. Crecimiento de <i>V. harveyi</i> . El valor sobre la curva de crecimiento indica la tasa de crecimiento (μ).	22
Figura 11. Curva de calibración de <i>V. harveyi</i>	22
Figura 12. Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> . Los valores sobre la curva de crecimiento indican la tasa de crecimiento.	23
Figura 13. Prueba de sensibilidad de la bacteria <i>V. harveyi</i> a las 24 h de inoculación con las concentraciones de EPS de 0.5, 0.1, 0.2 μl . Oxitetraciclina (control positivo).....	24
Figura 14. Prueba de sensibilidad de la bacteria <i>E. coli</i> a las 48 h de inoculación con las concentraciones de EPS de 0.5, 0.1, 0.2 μl . Oxitetraciclina (control positivo).	24
Figura 15. Calculadora de unidades formadoras de colonias de <i>E. coli</i> respecto a su densidad óptica.	41

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Valor de p estadístico de los azúcares presentes en EPS. Los valores con asterisco (*) indican una diferencia significativa entre los azúcares glucosa (Glu), xilosa (Xil) y galactosa (Gal). La segunda sección de la tabla indica con asterisco (*) que se observó una diferencia significativa de azúcares entre los días de cultivo. 20	20
Tabla 2. Pruebas bioquímicas a las que fue expuesta la bacteria <i>Vibrio</i> para corroborar su género. Fuente: Gómez-Gil (2003). 21	21

Capítulo 1. Introducción

La acuicultura es una actividad enfocada a la producción de especies acuáticas, se considera que ésta tendrá un papel de gran importancia en los próximos 30 años, ya que como lo indican datos de la FAO, la acuicultura aportó el 46 % de 179 millones de toneladas de pescado obtenidas a nivel mundial en el 2018, mientras que el 54 % fue aportado por la captura. Así mismo, la pesca se ha mantenido estable desde principios de los años 90 hasta la actualidad, con una fluctuación de captura de que va de los 86 a los 93 millones de toneladas de pescado y una captura histórica de 96 millones de toneladas en 2018. En contraste, la acuicultura ha venido aumentando su producción anual con una tasa promedio de 5.3% desde los años 2000 y su aporte para ese año fue del 27.5 % de 86 millones de toneladas de pescado. La acuicultura aumentó la producción de pescado desde el año 2000 a 2018 de 23.5 millones de toneladas a 81 millones de toneladas. Sin embargo, la población mundial se encuentra cerca de los 10,000 millones de personas, lo que ha ocasionado que la demanda de alimento siga en aumento. Con el incremento de la producción Acuícola se ha presentado también el incremento en la incidencia de problemas sanitarios, relacionados con agentes infecciosos, siendo las infecciones bacterianas las de mayor presencia en los cultivos (FAO, 2020).

El medio ambiente acuático es propicio para proliferación de bacterias y algunas de ellas pueden ser patógenas. Independientemente del tipo de hospedador, estos agentes infecciosos pueden alcanzar grandes densidades que afectan a los animales al su alrededor (Defoirdt *et al.*, 2011). Desde sus inicios la acuicultura se ha visto mermada por eventos de enfermedades infecciosas que ponen en riesgo la sustentabilidad de esta actividad. Particularmente, las enfermedades de origen bacteriano son las más reportadas en el cultivo de organismos acuáticos (Verschuere *et al.*, 2000; Erkinharju *et al.*, 2021). Por otra parte, se ha postulado que podría existir un incremento en los brotes de infecciones bacterianas en los cultivos de organismos acuáticos debido al incremento gradual de la temperatura causado por el calentamiento global.

Se han reportado al menos 13 géneros de bacterias patógenas para animales acuáticos; *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Flavobacterium*, *Francisella*, *Photobacterium*, *Piscirickettsia*, *Pseudomonas*, *Tenacibaculum*, *Yersinia*, *Lactococcus*, *Renibacterium*, *Streptococcus* y *Vibrio*. Entre las estrategias que se han establecido para evitar las enfermedades por bacterias están las medidas de bioseguridad que consisten en prácticas que minimizan el riesgo de introducir una enfermedad infecciosa a una instalación acuícola, tales como: la buena higiene del personal del granja, la cuarentena de organismos y la desinfección para optimizar la

calidad del agua, reducir la densidad de cultivo, dar alimento de buena calidad, mejoramiento genético de reproductores para la resistencia a enfermedades; sin embargo, en algunas ocasiones, estas bacterias pueden traspasar las medidas preventivas de bioseguridad adoptadas por la unidad acuícola y por consiguiente, se ha recurrido al uso de antibióticos (Pridgeon y Klesius, 2012; Yanong y Erlacher-Reid, 2012). Además, las bacterias no solo traen consigo efectos negativos en los cultivos de organismos acuáticos, sino que también traen una problemática de interés mundial que es la resistencia bacteriana por el mal uso de antibióticos y que puede afectar a la salud del ser humano (Verschuere *et al.*, 2000; Reverter *et al.*, 2020).

La producción animal para consumo humano utiliza los antibióticos no solo para erradicar una enfermedad bacteriana, sino también como medidas profilácticas (Barattini, 2012; WHO, 2017). Sin embargo, la problemática respecto a su uso es de interés mundial, puesto que las bacterias pueden generar resistencia a los antibióticos haciendo que estos sean cada vez menos efectivos y en consecuencia pueden generar un daño colateral en la salud humana (Santiago *et al.*, 2009; Vignesh *et al.*, 2011; OIE, 2016; WHO, 2017). Por tal motivo, organizaciones como la FDA (Food and Drug Administration), WHO (World Health Organization) y la OIE (Oficina Internacional de Epizootias) informan constantemente sobre esta gran problemática y regulan el uso y aprobación de estos.

Los antibióticos son un subgrupo de los antimicrobianos (moléculas naturales o sintéticas para inhibir el crecimiento de microorganismos) ampliamente utilizados para controlar el crecimiento bacteriano (Seija y Vignoli, 2006). Sin embargo, por su efecto negativo derivado de la utilización excesiva, desde años anteriores se ha venido prohibiendo y regulando su uso: en 1969, el Reino Unido prohibió el uso de antibióticos de medicina humana con el fin de promover el crecimiento animal, posteriormente en 1997, la Unión Europea prohíbe el uso de avopacin como promotor del crecimiento en animales y Estados Unidos prohíbe el uso de fluoroquinolonas y glicopéptidos en producción animal, en 2012 la OIE y la OMS recomiendan evitar el uso de antibióticos de uso en medicina humana con fines de controlar las enfermedades bacterianas en la producción animal (WHO, 2017).

Sin embargo, para el tratamiento de las enfermedades en animales, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) sugiere seguir las indicaciones de clasificación de antibióticos AMEG (Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group), en donde los antibióticos son clasificados en cuatro categorías: A, B, C y D. Los antibióticos de clasificación A, nunca deberán ser usados en la producción animal con fines de alimentación humana, mientras que los de clasificación B pueden ser utilizados condicionados a que la enfermedad en cuestión no pueda ser tratada con medicamentos de clasificación C y D. Así mismo, los medicamentos de

clasificación C pueden ser utilizados en la producción animal siempre y cuando si existan antibióticos alternativos en la medicina humana, es decir, que la bacteria patógena pueda ser erradicada con más de un antibiótico. Por otro lado, los de clasificación D son los antibióticos de primera línea para el tratamiento de enfermedades en animales (EMA, 2021).

De acuerdo con el Diario Oficial de la Federación 2004, en México se establecieron regulaciones para la aplicación de antibióticos en acuicultura, específicamente para la prevención y control de enfermedades en el cultivo de crustáceos y se autorizaron ocho antibióticos, así como sus dosis y tratamiento. Además, los antibióticos cloranfenicol, nitrofuranos, nitromidazoles y sulfonamidas (sulfas) fueron prohibidos para todos los crustáceos. En el 2012 la OIE y OMS recomendaron evitar el uso de antibióticos originalmente producidos para la medicina humana, con el fin de controlar enfermedades bacterianas en la producción animal (WHO, 2017).

La resistencia bacteriana se presenta cuando las bacterias desarrollan la capacidad para proliferar en presencia de antibióticos. Existen varios mecanismos básicos por los que las bacterias pueden generar resistencia a los antibióticos: por degradación e inactivación del antibiótico mediante enzimas, alteración del sitio de unión sobre la proteína blanco del antibiótico y, cambios en la estructura de la pared celular bacteriana para impedir el paso del antibiótico (Dever y Dermody, 1991; Pérez-Cano y Robles-Contreras, 2013).

Resistencia a los antibióticos β -lactámicos, penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y los monobactámicos son un grupo de antibióticos β -lactámicos que debido a sus características estructurales presentan la capacidad de adherirse a las enzimas carboxipeptidasas y transpeptidasas responsables de la síntesis de la pared celular bacteriana. Cuando el antibiótico se une, se interrumpe la síntesis de la pared celular bacteriana, por lo que se da la inhibición de la división celular y la lisis de la célula. Sin embargo, existen bacterias con la capacidad de producir enzimas (β -lactamasas, acilasas y esterases) que degradan estos antibióticos (Dever y Dermody, 1991; Moreno *et al.*, 2009).

Otro mecanismo de resistencia alternativo que es utilizado por las bacterias es la modificación del sitio de unión de la proteína blanco del antibiótico, como ocurre con resistencia al antibiótico meticilina (antibiótico β -lactámico) (Dever y Dermody, 1991; Moreno *et al.*, 2009; Pérez-Cano y Robles-Contreras, 2013). De esta manera no existe forma de que el antibiótico tenga un efecto sobre la bacteria.

La disminución de la permeabilidad de la pared celular bacteriana es otro de los mecanismos de resistencia empleado por bacterias. Este mecanismo bloquea el paso del antibiótico al interior de la bacteria debido a que se reduce el diámetro y número de porinas (proteínas que facilitan el intercambio de nutrientes y sustancias por la pared celular bacteriana) en la pared celular de la bacteria (Dever y Dermody, 1991; Moreno *et al.*, 2009; Pérez-Cano y Robles-Contreras, 2013).

También, es importante mencionar que muchos antibióticos pertenecen a la misma clase de medicamentos y que la resistencia a una molécula activa de un antibiótico en concreto, puede ocasionar la resistencia a toda una clase de medicamentos (OMS, 2016). Además, debido a que las bacterias cuentan con la capacidad de intercambiar material genético, esto por medio de transposones y plásmidos, ocasiona que la resistencia a una droga particular se puede esparcir rápidamente (Gómez-Gil *et al.*, 2000; OMS, 2016). El Reino Unido dio a conocer que 700, 000 personas mueren cada año debido a infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos y estiman que esta cifra puede aumentar a 10 millones de muertes anuales para 2050 si no se toman medidas (Pérez-Sánchez *et al.*, 2018). A nivel mundial hubo 1.27 millones de defunciones ocasionadas por bacterias resistentes a antibióticos en 2019 (Collaborators Antimicrobial Resistance, 2022).

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema que se ha reportado desde hace varios años, a pesar de ello, se siguen utilizando grandes cantidades de estos compuestos en la acuicultura (Manage, 2018). Por ello, es de suma importancia buscar nuevas opciones para mitigar las enfermedades ocasionadas por bacterias y que estas sean amigables con el medio ambiente y no causen un efecto negativo en la salud de los seres vivos. En este sentido, las microalgas se han planteado como una alternativa, ya que son productoras de diversas moléculas con actividad antibacterial y antiviral (Lauritano *et al.*, 2016).

1.1 Antecedentes

1.1.1 Microalgas y compuestos antimicrobianos

En la acuicultura, el cultivo de microalgas es una actividad clave para el desarrollo de larvas de peces, moluscos bivalvos y crustáceos por lo que se debe hacer una correcta selección de microalgas,

principalmente aquellas que proporcionen una calidad de nutrientes apropiada, que tengan una digestibilidad adecuada y que sean fáciles de cultivar (Sirakov *et al.*, 2015).

Las microalgas como *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros muelleri*, *Nannochloropsis oculata*, *Nitzschia* sp., *Thalassiosira* sp., *Chlorella* spp., *Dunaliella salina* y *Haematococcus pluvialis* son productoras de importantes ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés), esteroides y pigmentos que se utilizan para la elaboración de suplementos alimenticios y farmacéuticos, entre otros (Pratoomyot *et al.*, 2005; Durmaz *et al.*, 2008; Hamed, 2016; Lauritano *et al.*, 2016; FAO, 2018). Otras microalgas están reportadas como productoras de compuestos con actividad antimicrobiana (Amaro *et al.*, 2011; Kokou *et al.*, 2012), entre ellas *P. cruentum* (Kusmiyati y Agustini, 2006; Saracco-Alvarez, 2007).

Una particularidad de esta microalga es que se encuentra encapsulada por una pared celular compuesta por exopolisacárido sulfatado (EPS), que le dan una consistencia gelatinosa (Ramus y Groves, 1972; Arad *et al.*, 1985) y estos pueden representar hasta el 70% del peso total de la microalga (Geresh y Arad, 1991). La pared celular contiene al menos 10 azúcares, siendo la glucosa, galactosa y xilosa los de mayor proporción y también contiene sulfatos (Geresh y Arad, 1991; Bernaerts *et al.*, 2018). Aunque hasta el momento no se ha reportado la función biológica precisa del exopolisacárido sulfatado, Arad *et al.* (1985) reportaron que a mayor intensidad de luz se produce más polisacárido. Esto sugiere que una de las funciones biológicas del exopolisacárido es proteger a la célula de irradiancias extremas. Para dar más sustento a esta hipótesis, Arad y van Moppes (2013) aislaron una cepa de *Porphyridium* sp. de arena de mar, donde las condiciones ambientales son fluctuantes, especialmente a la exposición de altas intensidades de luz y sequía durante las mareas bajas, sugiriendo que el exopolisacárido podría estar protegiendo a la célula de estas condiciones, manteniendo a la célula con la hidratación suficiente y bloqueando la luz solar.

Algunos estudios indican que *P. cruentum* contiene moléculas que generan inhibición de las bacterias *Salmonella enteritidis*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio splendidus* y *V. harveyi*, (Kusmiyati y Agustini, 2006; Saracco-Alvarez, 2007 y Raposo *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha reportado que el extracto sulfatado de *P. cruentum*, tiene efectos antivirales contra la septicemia hemorrágica viral y el virus de la peste porcina africana (Fábregas *et al.*, 1999) y contra el herpes virus simple (HSV) (Huheihe *et al.*, 2002). Incluso, se ha sugerido el uso del EPS de *Porphyridium* sp. para frenar el creciente aumento de infecciones causadas por el SARS-CoV-2 (COVID-19) (Gaikwad *et al.*, 2020). Raposo *et al.* (2014) reportaron que el EPS producido por *P. cruentum* en concentraciones del 1% puede inhibir el crecimiento de *S. enteritidis*, puesto que, al exponer esta bacteria al EPS, se observó una disminución del 19 % de las

UFC (unidades formadoras de colonias). Además, Gargouch *et al.* (2021) encontraron que el EPS producido por *P. marinum* inhibió el crecimiento de *E. coli* en concentraciones de $62 \mu\text{g ml}^{-1}$, así como de *S. enteritidis* y *S. aureus* en concentraciones de $125 \mu\text{g ml}^{-1}$. Otros estudios con macroalgas también han reportado inhibición de la bacteria *E. coli* al ser expuesta al polisacárido sulfatado producido por el alga *Gracilaria ornata* en concentraciones de 1 mg ml^{-1} (Amorim *et al.*, 2012).

Por otro lado, estudios con macroalgas indican que el EPS aislado de *Spatoglossum asperum* inhibe el crecimiento de *Aeromonas hydrophila* formando halos de inhibición de 32 mm (Palanisamy *et al.*, 2017). Sivagnanavelmurugan *et al.* (2015) reportan que el extracto de *Sargassum wightii* actúa como agente antibacterial de *Vibrio parahaemolyticus*. Además, esta especie tiene un efecto antiviral importante en el virus de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés) (Sivagnanavelmurugan *et al.*, 2012). También se ha observado que compuestos sulfatados de otras especies de algas tienen actividad antiviral, ya que inhiben la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en concentraciones de $5 \mu\text{g ml}^{-1}$, el virus de la peste porcina africana a $20 \mu\text{g ml}^{-1}$, virus de la influenza tipo A en concentraciones de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$, poliomielitis y el virus del bosque Semliki en concentraciones mayores a $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ y también inhibe la replicación del virus del dengue a concentraciones $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Minkova *et al.*, 1966; González *et al.*, 1987; Boukgougnon *et al.*, 1993; Bouhlal *et al.*, 2011; Pujol *et al.*, 2012).

1.1.2 Bacterias del género *Vibrio*

Como se mencionó anteriormente, la acuicultura se ha visto mermada por agentes infecciosos como las bacterias, siendo la del género *Vibrio* una de las más reportadas en los eventos de mortalidades, ya que afectan tanto a organismos vertebrados como invertebrados, en todos sus estadios de vida, silvestres y de cultivo (Sugumar *et al.*, 1998; Zhang y Austin, 2000; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Cuéllar-Anjel, 2013; Zhang *et al.*, 2020; de Souza-Valente y Wan, 2021). El género *Vibrio* es habitante natural de los ambientes marinos y estuarinos y, además de causar daños a la salud de organismos acuáticos, también afecta a la salud humana (Morris y Black, 1985). Se ha visto que la proliferación de *Vibrio* está asociada principalmente a las aguas cálidas de los meses de verano (Blackwell y Oliver, 2008). Existen por lo menos 12 especies de este género que son patógenas para humanos (García-Bermejo, 2000).

Vibrio harveyi es una bacteria Gram negativa, de forma bacilo, que excreta enzimas para la degradación de la materia orgánica que se encuentra a su alrededor, con el fin de obtener nutrientes de los productos generados y se ha reportado que estas enzimas están relacionadas con eventos de mortalidades

importantes de organismos acuáticos (peces, crustáceos y moluscos) (Zhang y Austin, 2000; Labreuche *et al.*, 2010; Saulnier *et al.*, 2010; Cuéllar-Anjel, 2013; Zhang *et al.*, 2020). Por lo que, en más de 14 países se ha reportado vibriosis, enfermedad causada por bacterias del género *Vibrio* (Chen *et al.*, 2000), que ha afectado alrededor de 48 especies de peces marinos (Austin y Austin, 2007). De manera general, los signos de esta enfermedad pueden ser identificados en el comportamiento: letargo, inapetencia, desorientación. Externamente: metamorfosis lenta, malformación corporal, crecimiento lento, necrosis de tejido, opacidad de músculo, melanización, manchas rojas en las áreas ventrales y laterales, lesiones oscuras que se ulceran y exudan de sangre, lesiones corneales que generan una opacidad inicial, seguida de ulceración y evulsión del contenido orbitario, petequias en las bases de las aletas. Internamente: el intestino se llena con un líquido transparente y viscoso, meningitis, encefalitis, vasculitis, necrosis renal, daño hepático y renal. Sin embargo, es común que esta enfermedad se manifieste de manera aguda y severa de tal manera que la mayoría de los peces infectados mueren sin mostrar ningún signo clínico (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2020).

Así mismo, se estima que las pérdidas económicas en Tailandia causadas por la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND, por sus siglas en inglés) causada por *V. parahaemolyticus* en el período 2010-16 ascendieron a 7,380 millones de dólares. Adicionalmente, las bacterias *V. parahaemolyticus*, *Vibrio campbellii*, *V. harveyi*, *Vibrio owensii* y *Vibrio punensis*, también son responsables de causar esta enfermedad y son capaces de generar mortalidades del 100% en postlarvas de camarón. Esta enfermedad fue reportada por primera vez en el 2010 al sur de China, pero la enfermedad se expandió hasta Vietnam, Tailandia y Malasia (De Schryver *et al.*, 2014). El género *Vibrio* es uno de los principales grupos bacterianos asociados a mortalidades masivas en moluscos bivalvos siendo las especies *V. splendidus*, *Vibrio alginolyticus* y *V. harveyi* las más frecuentes (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010). Por ejemplo, *V. splendidus* y *V. harveyi* puede ocasionar mortalidades de hasta el 100% en el cultivo larval de *Crassostrea gigas* (Sugumar *et al.*, 1998; Saulnier *et al.*, 2010). El género *Vibrio* no se limita a causar enfermedades en una sola clase de especies, ya que afecta a moluscos, peces y crustáceos (Montánchez *et al.*, 2019).

1.2 Justificación

Siendo la acuicultura una actividad de gran importancia a nivel mundial tanto para el sostén alimenticio de miles de personas como para el cuidado y preservación de nuestros recursos naturales acuáticos, es necesario estar atentos con todos aquellos aspectos que representen un peligro para esta actividad. Entre ellos, la aparición y brotes de enfermedades infecciosas de origen bacteriano. Como ya se ha señalado

anteriormente, las Vibriosis se encuentran entre las más importantes, ya que puede causar hasta el 100% de mortalidad en el cultivo tanto de peces de aguas dulces como de aguas marinas (Austin y Austin, 2007). Entre las especies que se integran en el género *Vibrio*, *V. harveyi* de amplia distribución geográfica, ha sido aislado en Baja California como presunto agente causal de mortalidades de *Totoaba*, *Totoaba macdonaldi* (Trejo-Ramos, 2019) por lo que resulta en un candidato ideal para ser utilizado en este trabajo.

Por otra parte, mientras que el uso de antibióticos para el control de bacterias es cada vez más observado, señalado y limitado, es de suma importancia buscar nuevas alternativas que puedan hacer frente a estas problemáticas sin que ocasionen daños colaterales que tengan un impacto significativo en el ecosistema, en la salud animal y en la economía. En este sentido los productos generados a partir del metabolismo de las microalgas son una alternativa a tomar en cuenta para sustituir a los antibióticos sintéticos y poder prevenir, controlar o incluso erradicar enfermedades bacterianas mediante su uso correcto. Por lo anteriormente mencionado, en el presente trabajo se evaluará el efecto inhibitorio de del EPS producido por la microalga *Porphyridium cruentum* en la bacteria *Vibrio harveyi*.

1.3 Hipótesis

- La concentración de exopolisacárido sulfatado estará en función de las fases de desarrollo en que se encuentra *Porphyridium cruentum*.
- El exopolisacárido sulfatado producido por *Porphyridium cruentum* inhibirá el crecimiento de *Vibrio harveyi*.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

- Determinar la concentración del exopolisacárido sulfatado producido por la microalga *Porphyridium cruentum* en sus diferentes fases de desarrollo y evaluar su actividad antibacteriana en *Vibrio harveyi*.

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración del exopolisacárido sulfatado producido por *Porphyridium cruentum* en las diferentes fases de crecimiento.
- Determinar la concentración de azúcares y sulfatos del exopolisacárido de *Porphyridium cruentum*.
- Evaluar la actividad antibacteriana del exopolisacárido sulfatado de *Porphyridium cruentum* sobre *Vibrio harveyi*.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cultivo de *Porphyridium cruentum*

La microalga *Porphyridium cruentum* se obtuvo del Cepario de Microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE. Posteriormente, se realizó su escalamiento desde 25 ml, hasta 2 L.

2.1.1 Condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron en agua de mar estéril (autoclave a 121 °C por 20 min) y enriquecida con el medio “f/2” (Guillard y Ryther, 1962). Estos se inocularon con 1.5×10^5 cél ml⁻¹ y se mantuvieron con aireación constante, temperatura promedio (22 °C), el pH se mantuvo entre 8 y 8.5, por medio de inyección de CO₂. La intensidad de luz para los cultivos fue de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, proporcionada por medio de lámparas fluorescentes de luz blanca fría.

2.1.2 Recuento celular y tasa de crecimiento

Diariamente se tomaron muestras de los cultivos para el recuento celular y verificar la ausencia de protozoarios, para lo cual se utilizó un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad. La tasa de crecimiento se obtuvo con la fórmula indicada en Arredondo-Vega y Voltolina (2007).

$$\mu = \frac{\log_2(X_2) - \log_2(X_1)}{(T_2 - T_1)} \quad (1)$$

Donde:

- μ = tasa de crecimiento
- Log_2 = logaritmo base dos
- X_1 = concentración celular inicial

- X_2 = concentración celular final
- T_1 = tiempo inicial
- T_2 = tiempo final

2.1.3 Extracción de exopolisacárido sulfatado (EPS)

Es importante mencionar que se analizaron diferentes metodologías previamente evaluadas y publicadas en la literatura científica: Abdala-Díaz *et al.* (2010); Mendonça, (2014) y Gargouch *et al.* (2021), sin embargo, se seleccionó la indicada por Hernández-Garibay (2011), quien recomienda realizar la filtración con tierra de diatomeas, además, de precipitar el EPS con etanol al 96%.

Se recolectaron volúmenes conocidos de los cultivos de microalgas en sus diferentes fases de crecimiento. Cada uno de los volúmenes cosechados se homogeneizó con 10 gramos de tierra de diatomeas. Posteriormente, se filtró por vacío en un matraz kitasato por medio de un embudo con malla de plástico de 200 μm y filtro de 10 μm . La mezcla se filtró hasta que la tierra de diatomeas estuviera seca. El volumen recolectado se filtró por 1.2 μm para retirar la tierra de diatomeas remanente y posteriormente se llevó a una concentración de 0.1 M con NaCl y se mezcló con dos volúmenes de etanol, agitando constantemente con una varilla de vidrio.

A continuación, se recolectaron las fibras formadas de EPS y se compactaron para formar un pellet, mismo que fue exprimido manualmente. El pellet se colocó en 25 ml de etanol al 70% con agitación constante, a temperatura ambiente por 10 minutos, repitiendo este mismo paso para eliminar la mayor cantidad de sales. Este paso se repitió nuevamente con etanol al 96 % para deshidratar la muestra. Después, el pellet se puso a secar a 60 °C por 24 h. Las fibras que no pudieron ser recolectadas al inicio fueron precipitadas a 3500 rpm (Thermo Scientific Megafuge 16R) por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó y el EPS fue resuspendido en 25 ml de etanol al 70%. Este paso se repitió para eliminar la mayor cantidad de sales. El sobrenadante se decantó y se siguió el mismo procedimiento de secado mencionado anteriormente.

2.1.4 Peso seco total (PST) y peso orgánico (PO) de EPS

Después del tiempo de secado, los pellets completos de EPS se pesaron en una balanza analítica AND GR-202. Posteriormente, se tomaron pequeñas muestras e igualmente se colocaron a 60 °C, y se pesaron cada 24 h hasta obtener el PST constante.

Una vez obtenido el peso constante del EPS, las muestras se colocaron en una mufla a 600 °C por 6 h. Las cenizas se pesaron (PC) y el peso orgánico (PO) se obtuvo por la diferencia entre el PST y el PC.

2.1.5 Purificación del EPS

Para eliminar la mayor cantidad de sales del EPS se utilizó la técnica de diálisis. Se tomaron muestras de peso seco conocido, se homogeneizaron en agua destilada (4 mg ml^{-1}) y se colocaron en una membrana de diálisis de 14 KDa y 10 volúmenes de agua desionizada y se dejaron en agitación por 18 h. Después, la muestra se recolectó en tubos falcón de 50 ml y se liofilizaron por 24 h (Liofilizador LABCONCO). Posteriormente se tomaron muestras conocidas de EPS y se colocaron en una mufla a 600 °C por 6 h para obtener el PC (Parolis *et al.*, 1996; Yim *et al.*, 2004; Raposo *et al.*, 2014; Priyanka *et al.*, 2014).

2.1.6 Análisis de sulfatos

El contenido de sulfatos del EPS fue analizado con la metodología de Craigie y Leigh (1978). Para esto, se tomaron 5 mg de cada una de las muestras y se hidrolizaron con 1ml de HCl 2N por 2 h en baño María (100 °C), después, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se aforaron a 10 ml con agua destilada. Las muestras se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 4,500 rpm por 5 min. Se tomó 1 ml del sobrenadante y este fue llevado a 10 ml con HCl 0.05N, se agitó y se agregó 0.5 ml de BaCl₂ Gelatin. La muestra se agitó vigorosamente y se dejó reposar por 30 min para después leer en el espectrofotómetro a 550 nm. El cálculo para la cuantificación de sulfatos se realizó mediante la ecuación de la curva de calibración obtenida previamente, utilizando como estándar K₂SO₄ (3 mg ml^{-1}).

2.1.7 Análisis de azúcares

Los azúcares xilosa, glucosa y galactosa del EPS fueron cuantificados mediante la metodología descrita por Whyte (1987). Para la cuantificación se utilizaron las muestras dializadas previamente. Se realizaron curvas de calibración con estándares de cada uno de los azúcares. Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro a las longitudes de onda de 478 nm, 488 nm y 489 nm, respectivamente.

2.2 Cultivo de la bacteria *Vibrio harveyi*

2.2.1 Reactivación de la bacteria *V. harveyi*

La bacteria de *V. harveyi* se obtuvo del Banco de Germoplasma del CICESE en estado de criopreservación. Por lo tanto, con un asa bacteriológica esterilizada se tomó una muestra de la bacteria, se colocó en medio TCBS y se incubó por 24 h a 27 °C. Transcurrido este tiempo, del cultivo de la bacteria se tomó una muestra, con asa bacteriológica y se inoculó en 15 ml de medio líquido Luria-Bertani (LB), se dejó incubó a 27 °C por 24 h y 200 rpm (Gutiérrez-Jiménez *et al.*, 2015; Rain-Franco *et al.*, 2021; Vásquez-Yeomans., Com. Pers., 2021; Culture Collections web).

Posteriormente, se identificó a la bacteria como género *Vibrio*, mediante pruebas bioquímicas (tinción Gram, gota colgante, sensibilidad a O/129, oxidación / fermentación de glucosa, crecimiento en agua peptonada sin sal (Crocí *et al.*, 2007). Para conocer la especie de la bacteria, la identificación fue complementada con el kit de identificación bacteriana marca BIOLOG (Gómez-Gil *et al.*, 1998; Crocí *et al.*, 2007).

2.3 Curva de crecimiento de *Vibrio harveyi*

Para determinar el crecimiento de la bacteria *V. harveyi*, se realizó una curva de crecimiento, para lo cual, se tomaron 5 colonias de la bacteria cultivada en placas de agar con medio TCBS y se inocularon en medio LB líquido, se dejó incubar por 12 h, a 27 °C y 200 rpm. Después de transcurrido este tiempo, se midió la densidad óptica del cultivo (DO) y se cosechó el 10% para inocular en medio LB, en un volumen final de 50 ml. Este cultivo se incubó por 3 h a 27 °C y 200 rpm y se tomó el 10% de este para inocular un nuevo cultivo

en medio LB en las mismas condiciones de agitación y temperatura. La DO inicial se registró y se etiquetó como la hora cero, seguidamente se fueron tomando muestras del cultivo c/h durante 9 h para medir su DO y graficar el crecimiento de *V. harveyi* (García-Triana, 2005).

2.3.1 Curva de calibración del crecimiento de *V. harveyi*

Después de las 9 h de cultivo de *V. harveyi*, se realizaron diluciones de este para obtener distintas lecturas de DO en escala de 0.5, también, de cada una de las diluciones se realizó un inóculo en medio TCBS para su posterior conteo de UFC/ml. Una vez obtenidos los conteos se graficó la curva de calibración (Moniruzzaman, 2018).

2.4 Prueba de sensibilidad de la bacteria *V. harveyi* al EPS de *P. cruentum*

Con base en los estudios revisados: Amorim *et al.* (2012); Gargouch *et al.* (2021); Palanisamy *et al.* (2017), se prepararon tres concentraciones del exopolisacárido sulfatado (0.05, 0.1 y 0.2 mg ml⁻¹ con base en el PO del EPS), en DMSO al 10%. Posteriormente, se cultivó *V. harveyi* hasta llegar a una DO de 1.31 que correspondió a 1.5 x10⁸ ufc ml⁻¹ y a su fase de crecimiento exponencial.

Después de haber alcanzado la DO de 1.31, se traspasaron 10 ml del cultivo de *V. harveyi* a un tubo de ensayo y se impregnó un isopo estéril (el exceso fue exprimido con las paredes del tubo) para inocular 12 cajas Petri con medio Mueller-Hinton pasando el isopo por toda la superficie del medio, se utilizó un isopo por caja Petri. A cada caja inoculada se le colocaron tres sensidiscos (Hardy diagnostics de 6 mm) con 20 µl de la concentración correspondiente del EPS. También se realizó un control positivo al cual se le agregaron 15 µl de antibiótico oxitetraciclina (15 mg ml⁻¹). La metodología empleada se basó en el manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión de Sacsquispe-Contreras y Velásquez-Pomar, (2002) y el manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de Cavalieri *et al.* (2005).

2.5 Prueba de sensibilidad de la bacteria *Escherichia coli* al EPS de *P. cruentum*

La bacteria *E. coli* se utilizó como testigo al haber amplia información sobre el efecto antibacteriano que tienen los EPS extracelulares de distintas algas rojas sobre esta bacteria.

La bacteria *E. coli* (TG1 electrocompetente) fue obtenida del Departamento de Innovación biomédica del CICESE.

Para la prueba de sensibilidad con la bacteria *E. coli*, se siguió la misma metodología que para la prueba de sensibilidad de la bacteria *V. harveyi* (por 12 h, a 27 °C y 200 rpm), pero se cultivó a *E. coli* hasta alcanzar una DO de 2.7, que es donde el cultivo se encuentra en su fase exponencial. Posteriormente, una muestra del cultivo de *E. coli* en su fase exponencial fue diluida a DO de 0.3 la cual equivale a 10^8 ufc ml⁻¹ (Barquero *et al.*, 2012; Yap y Trau, 2019; anexo 1).

Capítulo 3. Resultados

El cultivo de *P. cruentum* tuvo una duración de ocho días, donde se observaron las diferentes fases de crecimiento. La fase exponencial inició el día dos y se mantuvo hasta el día siete de cultivo, la máxima tasa de crecimiento (μ : divisiones día⁻¹) fue de 1.3 al día 4. Posteriormente el cultivo entró a su fase estacionaria el día 8 con una μ de 0.02 div día⁻¹. La máxima densidad celular fue el día 8 de cultivo con $2.66 \pm 0.09 \times 10^6$ cél ml⁻¹ (Fig. 1).



Figura 1. Crecimiento de *Porphyridium cruentum* en cultivo estático.

3.1 Peso orgánico (PO) de *P. cruentum*

La biomasa ($\mu\text{g ml}^{-1}$) de *P. cruentum* obtenida con base en el peso orgánico (Fig. 2), se incrementó a través del tiempo, con diferencias significativas en los días de muestreo ($p < 0.05$). El valor máximo de PO fue de $582 \pm 27.71 \mu\text{g ml}^{-1}$ al día 8 de cultivo y mínimo de $40.25 \pm 3.69 \mu\text{g ml}^{-1}$ al día 2 de cultivo, es decir, existe una correlación directa entre el tiempo de cultivo y el peso orgánico de *P. cruentum*.

En el peso orgánico por célula (PO, pg cél⁻¹) de *P. cruentum* (Fig. 3) no se encontraron diferencias significativas en el PO obtenido en los días 2, 4 y 8 ($p > 0.05$), donde se obtuvo un valor promedio de 216.27 pg cél⁻¹. El PO obtenido en el día seis ($138.06 \text{ pg cél}^{-1}$), fue similar ($p > 0.05$) al obtenido en el día 4 ($192.7 \text{ pg cél}^{-1}$); sin embargo, sí se observaron diferencias significativas entre el valor obtenido en el día 6 con relación a los días 2 y 8 ($P < 0.05$).

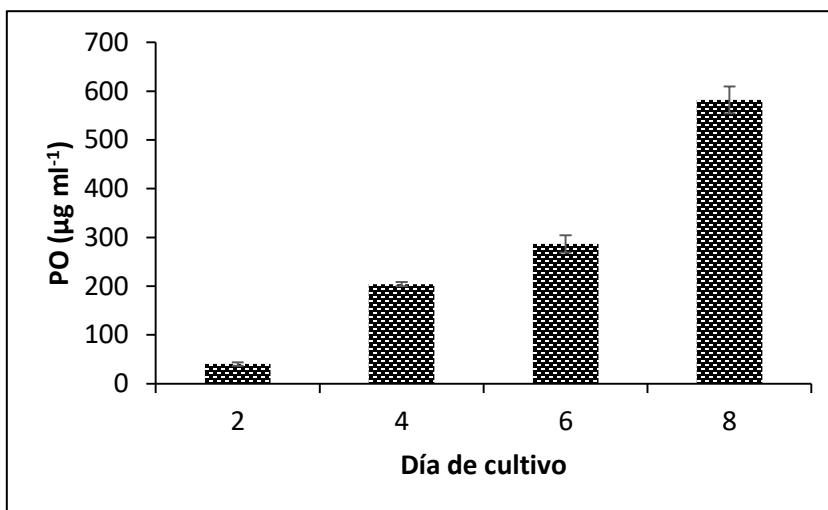


Figura 2. Peso orgánico (PO, µg ml⁻¹) de *Porphyridium cruentum* durante los diferentes días de muestreo del cultivo estático.

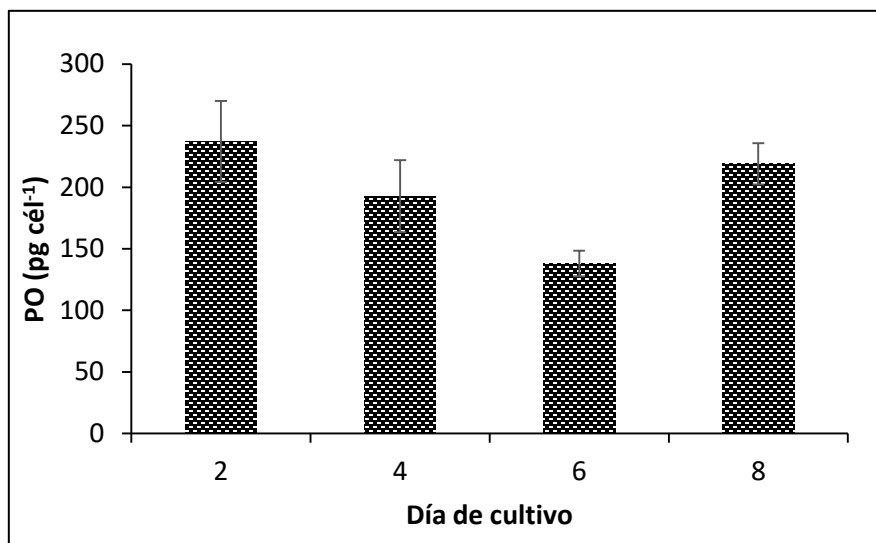


Figura 3. Peso orgánico (pg cél⁻¹) de *Porphyridium cruentum* durante los diferentes días de muestreo.

3.2 Exopolisacárido sulfatado (EPS) y sulfatos

Respecto a la producción de EPS no se encontraron diferencias significativas ($p = 0.686$) en el contenido de EPS en los diferentes días de muestreo. El promedio de EPS fue de 2.84 ± 0.14 mg ml⁻¹ (Fig. 4).

Con relación al contenido de sulfatos en el EPS, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en producciones en los diferentes días de cultivo. El porcentaje promedio de sulfatos en el EPS fue de 37.38 ± 9.43 % (Fig.5).

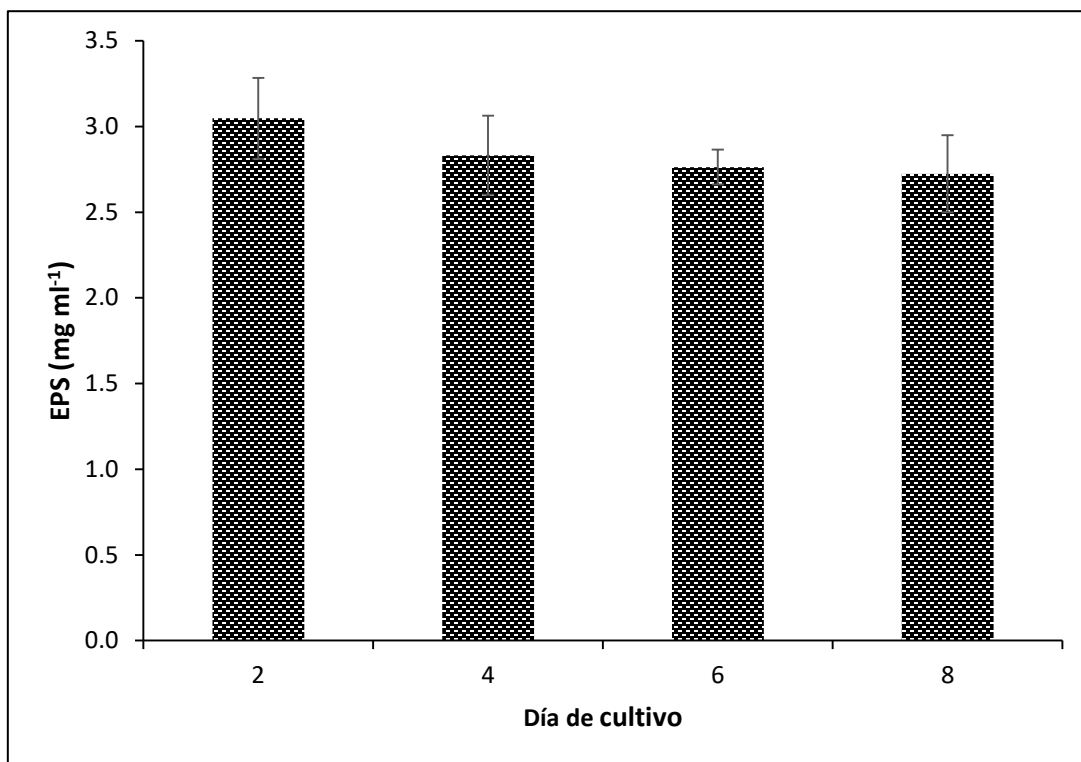


Figura 4. Concentración (mg ml⁻¹) de exopolisacárido sulfatado producido por *P. cruentum* en cultivo estático.

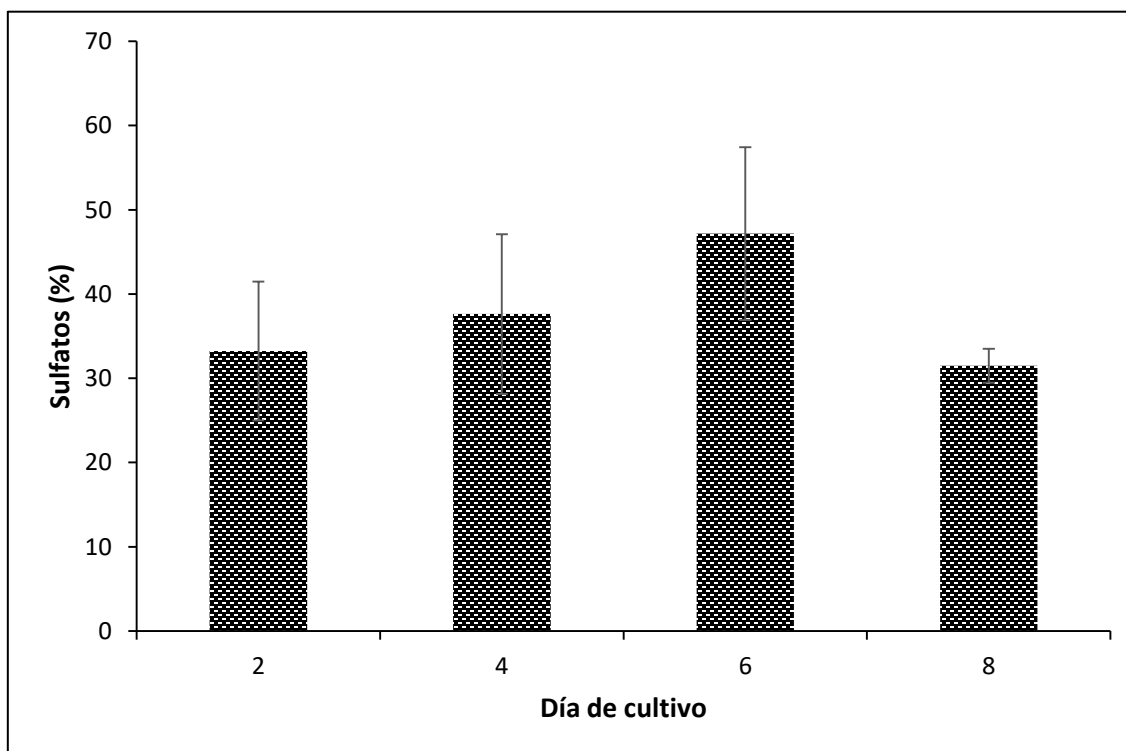


Figura 5. Concentración (%) de sulfatos en el exopolisacárido sulfatado (EPS) producido por *P. cruentum* en cultivo estático.

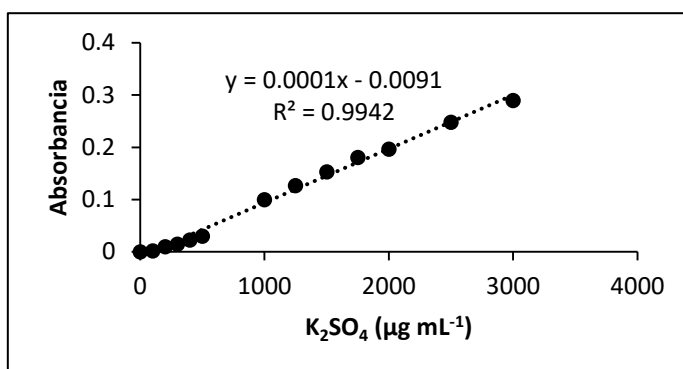


Figura 6. Curva de calibración de sulfatos realizada con el reactivo K_2SO_4 .

3.3 Concentración de azúcares del exopolisacárido (EPS) de *P. cruentum*

Las curvas de calibración realizadas para la cuantificación de azúcares, en concentraciones de 0 a 200 $\mu g mL^{-1}$ obtuvieron una r^2 a 0.99 (Fig. 7).

El contenido de azúcares del EPS de *P. cruentum* se muestra en la fig. 8. El mayor contenido de azúcares se obtuvo en el día 4 de cultivo ($p < 0.05$), con valores de 20.13% para glucosa, 23.64% para xilosa y 28.82% para galactosa. En los porcentajes obtenidos los días 2, 6 y 8 no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$). El EPS presentó un mayor contenido de galactosa que de glucosa en los días 4, 6 y 8 de cultivo, mientras que en el día 2 no se observaron diferencias entre los azúcares producidos. Además, no se encontraron diferencias significativas entre la galactosa y la xilosa, a excepción del día 4 de cultivo. Tampoco se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de glucosa y xilosa en ninguno de los días de muestreo (Fig. 5 y Tabla 1).

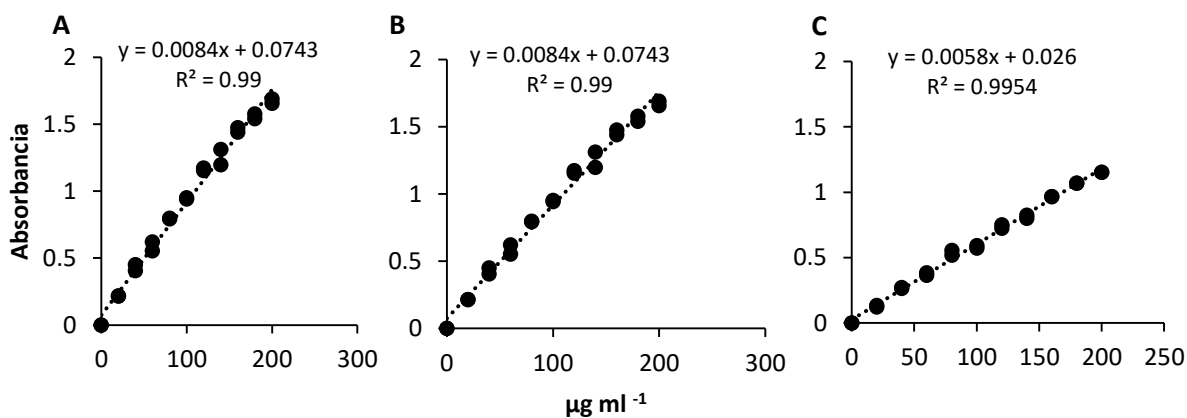


Figura 7. Curvas de calibración de azúcares: (A) Glucosa, (B) Xilosa, (C) Galactosa

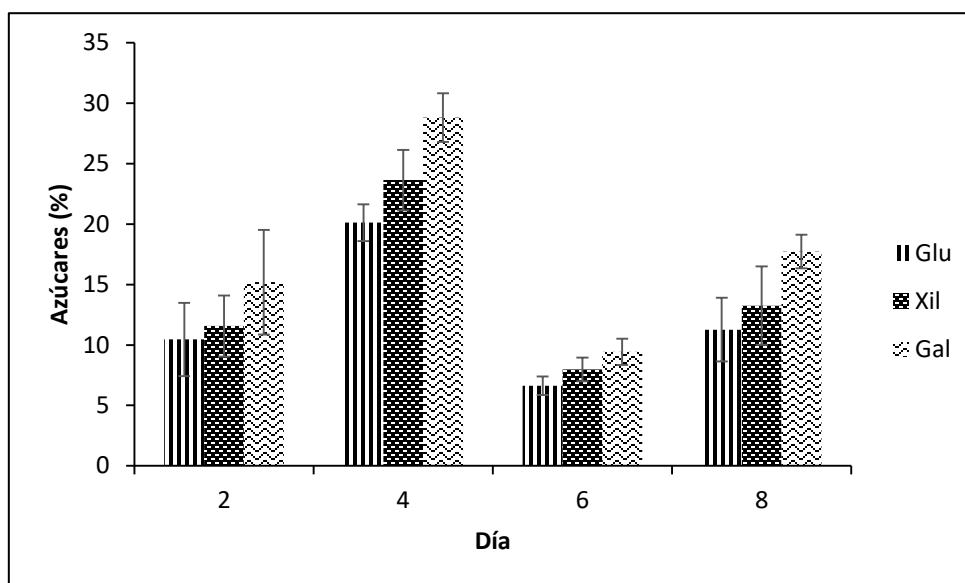


Figura 8. Concentración (%) de azúcares obtenidos en el exopolisacárido (EPS) de *P. cruentum*. Glucosa (Glu), Xilosa (Xil) y Galactosa (Gal).

Tabla 1. Valor de p estadístico de los azúcares presentes en EPS. Los valores con asterisco (*) indican una diferencia significativa entre los azúcares glucosa (Glu), xilosa (Xil) y galactosa (Gal). La segunda sección de la tabla indica con asterisco (*) que se observó una diferencia significativa de azúcares entre los días de cultivo.

Día de cultivo						
Azúcares	2	4	6	8		
Glu-Gal	0.273	0.004*	0.027*	0.047*		
Xil-Gal	0.438	0.048*	0.231	0.158		
Xil-Glu	0.915	0.171	0.273	0.628		
Días de cultivo (en pares)						
	2-4	2-6	2-8	4-6	4-8	6-8
	0.002*	0.220	0.965	0.000*	0.004*	0.117

3.4 Peso orgánico (PO) del EPS

El PO obtenido en el EPS fue similar entre los días de muestreo ($p > 0.05$), con porcentajes de 15.5 % a 32.7% y con un promedio de 22.61 ± 10.71 % (Fig. 7). También, se analizó el peso orgánico del EPS sin purificar (diálisis) en donde se obtuvo un PO de 8.02 ± 1.05 %.

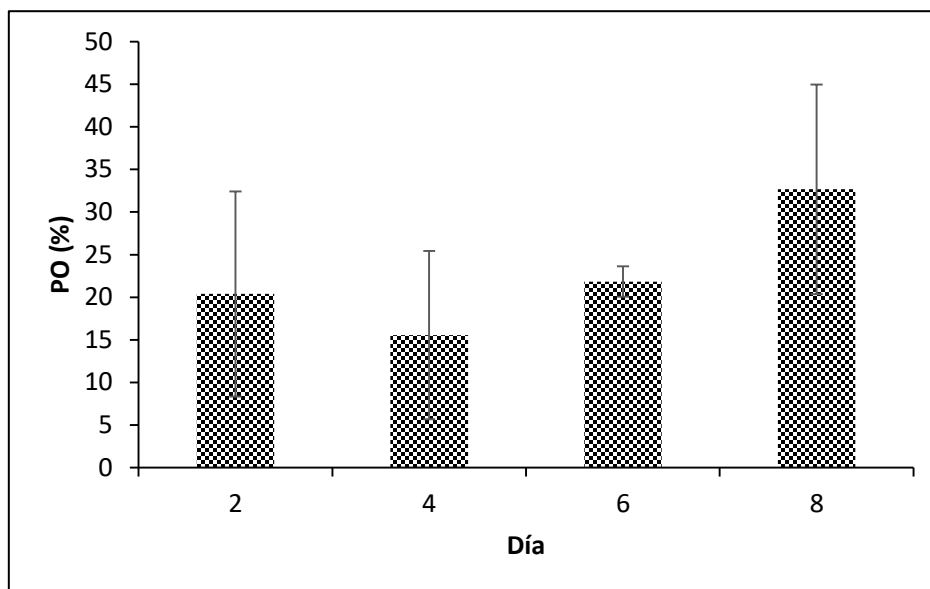


Figura 9. Peso orgánico (PO, %) del exopolisacárido sulfato (EPS) producido por *P. cruentum* en diferentes días de muestreo durante el cultivo estático.

3.5 Identificación de la bacteria *Vibrio harveyi*

Las pruebas bioquímicas realizadas indicaron que la bacteria pertenece al género *Vibrio* (tabla 3). De igual manera, la microplaca de identificación microbiana GENIII (BIOLOG) indicó un 99.7% de probabilidad que se trata de la bacteria *Vibrio harveyi*.

Tabla 2. Pruebas bioquímicas a las que fue expuesta la bacteria *Vibrio* para corroborar su género. Fuente: Gómez-Gil (2003).

Prueba	Resultado
Gram	-
Motilidad	+
acidificación de glucosa	+
Gas de glucosa	-
Oxidasa	+
Sensibilidad al compuesto 0/129	+
Oxidación/Fermentación de la glucosa	F
Crecimiento 0% NaCl	-

3.5.1 Curva de crecimiento y calibración de la bacteria *Vibrio harveyi*

La bacteria *V. harveyi* mantuvo una fase exponencial de 3 horas presentando una tasa de crecimiento (μ) máxima de 1.83 a la hora 2 de cultivo (Fig. 10). Además, en la figura 11 se observa que para que a una DO de 1.1 se obtiene una concentración bacteriana de 1.5×10^8 .

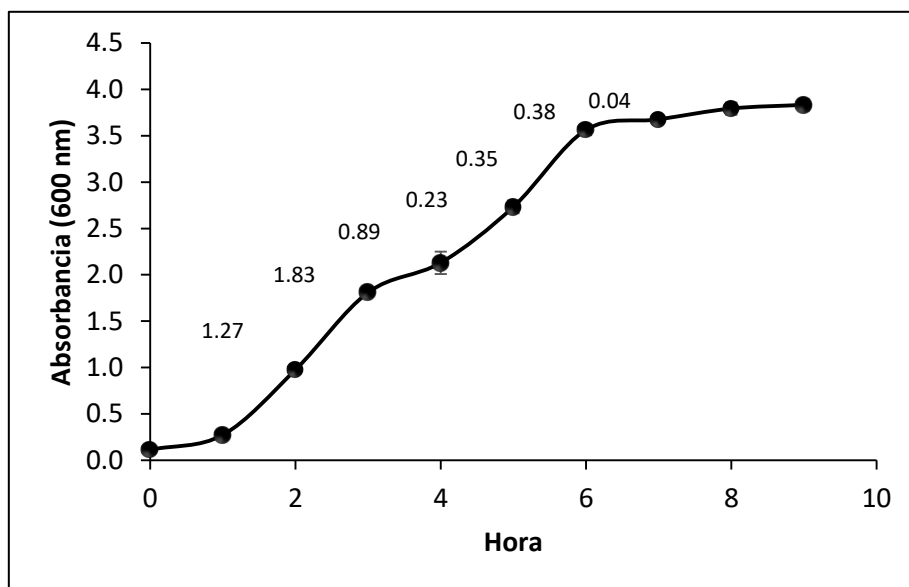


Figura 10. Crecimiento de *V. harveyi*. El valor sobre la curva de crecimiento indica la tasa de crecimiento (μ).

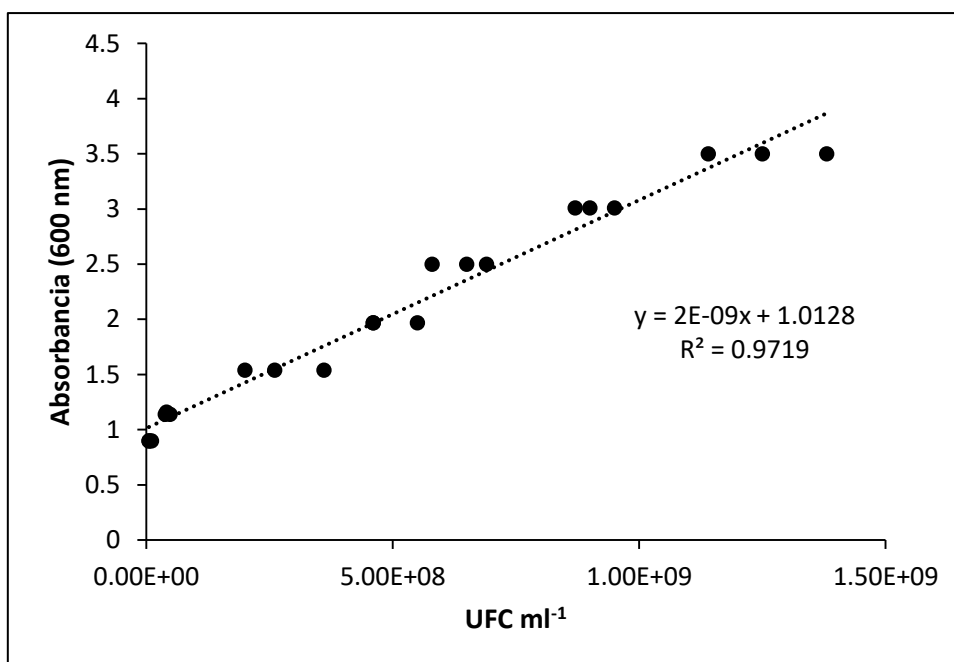


Figura 11. Curva de calibración de *V. harveyi*.

3.6 Curva de crecimiento de la bacteria *E. coli*

La bacteria *E. coli* mantuvo su fase exponencial durante 3 horas, con una tasa de crecimiento (μ , divisiones h^{-1}) máxima de 2.3 a las 3 horas, después de este tiempo presentó una fase estacionaria por un periodo de una hora y nuevamente presentó crecimiento, con una μ de 0.5 y a la siguiente hora nuevamente entró a fase estacionaria y enseguida a fase de muerte (Figura 11).

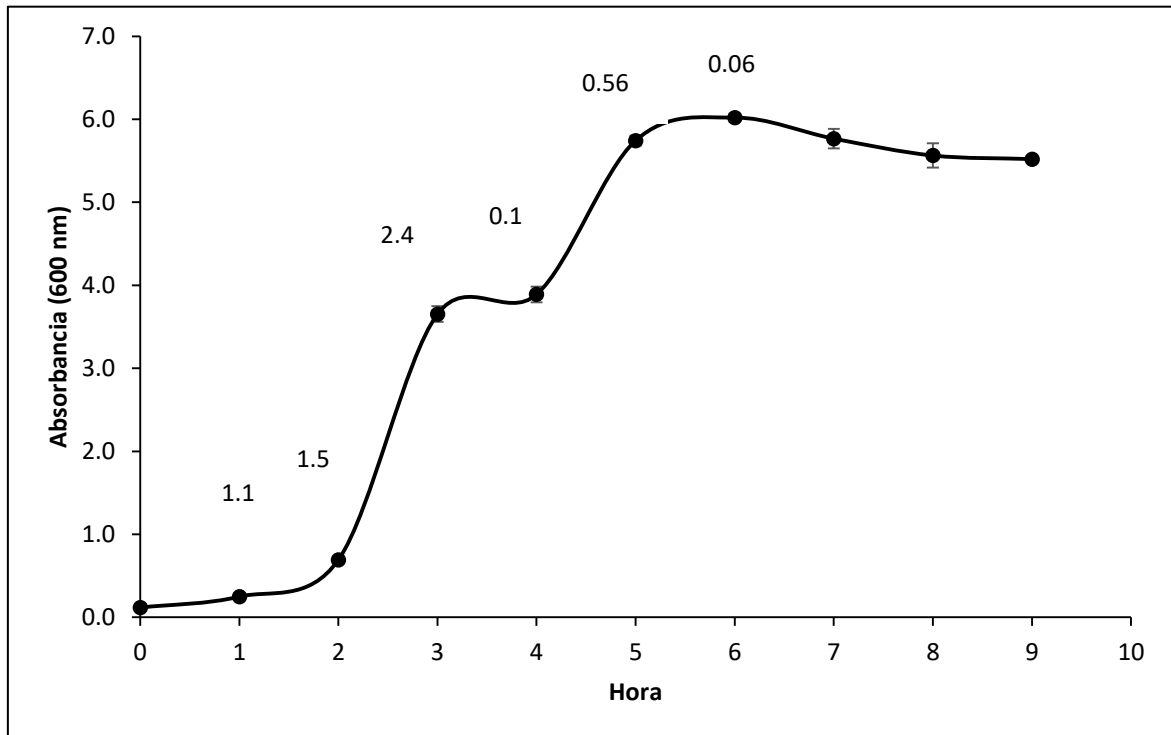


Figura 12. Curva de crecimiento de *E. coli*. Los valores sobre la curva de crecimiento indican la tasa de crecimiento.

3.7 Prueba de sensibilidad de las bacterias *V. harveyi* y *E. coli* al exopolisacárido sulfatado de *P. cruentum*

El EPS producido por *P. cruentum* no generó inhibición en las bacterias *E. coli* ni *V. harveyi* durante el periodo de inoculación (24 h y 48 h, respectivamente), en ninguna de las concentraciones evaluadas de EPS (Figura 12 y 13). Por otro lado, el antibiótico oxitetraciclina sí generó halos de inhibición, tomando este último como control positivo.

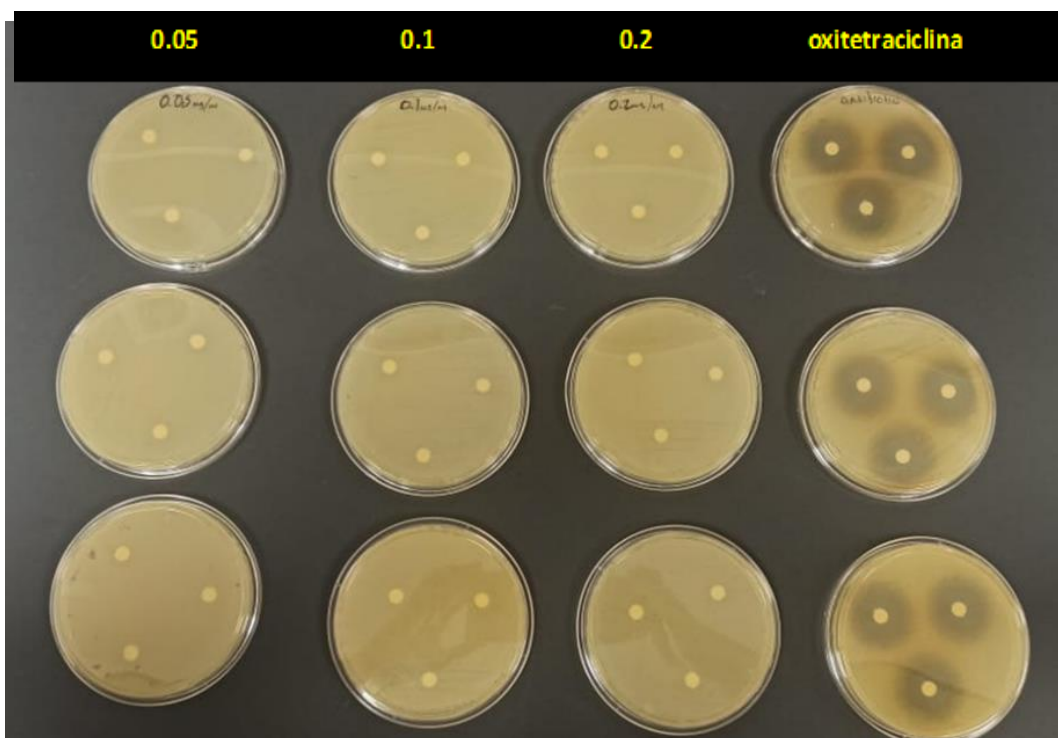


Figura 13. Prueba de sensibilidad de la bacteria *V. harveyi* a las 24 h de inoculación con las concentraciones de EPS de 0.5, 0.1, 0.2 μ l. Oxitetraciclina (control positivo).

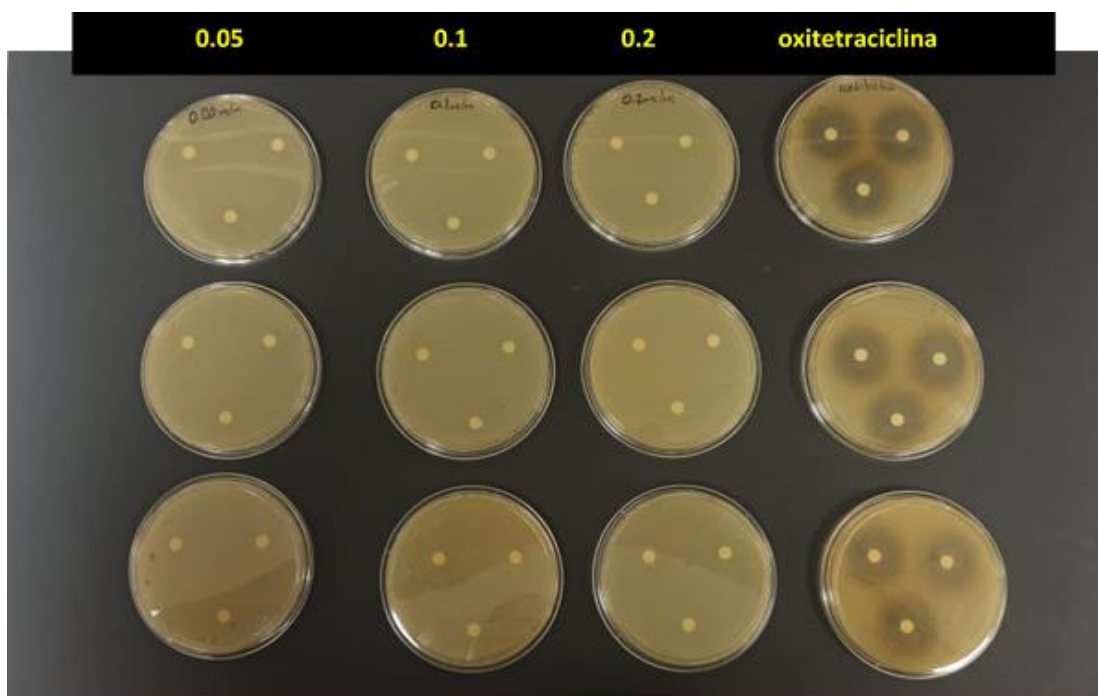


Figura 14. Prueba de sensibilidad de la bacteria *E. coli* a las 48 h de inoculación con las concentraciones de EPS de 0.5, 0.1, 0.2 μ l. Oxitetraciclina (control positivo).

Capítulo 4. Discusión

Las microalgas producen una gran variedad de compuestos de interés, los cuales tienen múltiples aplicaciones en diferentes industrias, y por ello han sido extensamente estudiadas en las últimas décadas (Medina-Jasso *et al.*, 2012). Los compuestos que producen pueden variar en su concentración, dependiendo de las condiciones de cultivo, principalmente la intensidad de luz, la temperatura, el tipo de medio de cultivo, así como de la fase de crecimiento donde es cosechada (Raposo *et al.*, 2013).

La microalga roja *Porphyridium* spp., es ampliamente conocida por su capacidad para producir compuestos bioactivos de alto valor económico (Li *et al.*, 2019), como el ácido graso araquidónico (20:4n6), el cual, bajo condiciones limitantes de temperatura, intensidad de luz o pH, llega a formar casi el 40% del total de ácidos grasos de esta especie, además, del pigmento ficoeritrina y un exopolisacárido sulfatado (EPS) (Cohen, 1990).

Así mismo, Arad *et al.* (1985), cultivaron a *Porphyridium* sp., en intensidad de luz baja ($3.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y alta ($15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), y mencionan que en esta última intensidad obtuvieron una mayor producción de EPS (2.7 mg ml^{-1}) a los 15 días de cultivo, cuando el cultivo estaba en fase estacionaria y con una biomasa de $50 \times 10^6 \text{ cél ml}^{-1}$. Es decir, la intensidad de luz influye en la producción de EPS. En el presente trabajo no se observaron cambios en el contenido de EPS en las diferentes fases de crecimiento, en promedio se obtuvieron 2.84 mg ml^{-1} , concentración similar a la obtenida por los autores antes mencionados, pero en una biomasa mucho menor ($2.66 \times 10^6 \text{ cél ml}^{-1}$). La diferencia en densidad y producción de EPS puede estar relacionada con la intensidad de luz utilizada en ambos trabajos, ya que, en este estudio, se utilizó una intensidad de luz de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (10 veces más que la mayor intensidad utilizada por Arad y colaboradores (1985).

El EPS posee carga negativa a causa de que contiene grupos sulfatos y es precisamente esta propiedad del EPS a la que se le atribuye su actividad antimicrobiana (Cohen y Arad, 1998; Sivagnanavelmurugan *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2016). El EPS puede repeler electrostáticamente a las bacterias debido a que su pared celular tiene un alto contenido de lipopolisacáridos con carga negativa, lo que evita que las bacterias puedan adherirse en el tejido huésped (Arlov *et al.*, 2021). Este mecanismo también ha sido observado en virus al agregar el EPS ya que se adhiere a las capsulas virales con cargas positivas evitando la interacción entre el virus y la célula hospedadora (Ghosh *et al.*, 2009; Bouhlal *et al.*, 2011).

Se ha reportado que el EPS de *Porphyridium* spp. puede contener de 1 a 14 % de sulfato (Raposo *et al.*, 2013; Soanen *et al.*, 2016) y que la variación del porcentaje de sulfatos presentes en el EPS es debido a la especie de alga (Arad y van Moppes, 2013). En este trabajo el contenido de sulfatos en *P. cruentum* fue de 37.38 %, que es mayor a lo reportado por los anteriores autores, no obstante, el resultado del presente trabajo es cercano al obtenido a Bernaerts *et al.* (2018), quienes obtuvieron un porcentaje del 40 % de sulfatos en EPS. Estos mismos autores, indican que los valores relativos de sulfatos en el EPS reportados previamente podrían estar subestimando la cantidad real, ya que no especifican la pureza del EPS. Entre las impurezas podrían ser fragmentos de la pared celular y residuos de lípidos de la microalga.

En trabajos anteriores ya se ha reportado como está conformado el perfil de azúcares presentes en el EPS de *Porphyridium* sp. (Geresh y Arad, 1991; Bernaerts *et al.*, 2018). Así mismo, también se ha demostrado que la xilosa se encuentra en mayor proporción con 55 %, seguida de la galactosa con 30% y la glucosa con 12% (Soanen *et al.*, 2016). Estos mismos autores mencionan que se presentaron variaciones en las proporciones del contenido de azúcares en el EPS al cambiar el medio de cultivo, ya que obtuvieron pequeñas disminuciones en el caso de xilosa (47.0 %), galactosa (28.0 %), pero incrementos en la glucosa (18 %). En diversos estudios igualmente se han encontrado variaciones amplias en las concentraciones de azúcares en *Porphyridium* spp., que van desde el 25.8 % al 55.0 % para xilosa, de 11.9 % al 42.0 % para galactosa y de 11.0 % al 25.0 % para glucosa, para las especies *P. marinum*, *P. sordium*, *P. purpureum* y *P. aeruginum* (Ramus y Groves 1972; Roussel *et al.*, 2015; Soanen *et al.*, 2016 y Medina-Cabrera *et al.*, 2020).

En el caso de *P. cruentum*, las concentraciones reportadas por Casas-Arrojo *et al.* (2021) son muy bajas para xilosa (0.7 %) y glucosa (7.4 %), mientras que la galactosa está dentro del intervalo encontrado por los autores mencionados (23.0 %). En esta tesis, los mayores valores obtenidos de xilosa y glucosa fueron 20.12 % y 23.6 %, respectivamente, mientras que la galactosa, aunque también fue superior (con 28.9 %), la diferencia no es tan pronunciada como en el caso de los otros dos azúcares. Estos resultados se presentaron en la fase de máximo crecimiento exponencial, cuando *P. cruentum* tenía una tasa de crecimiento de 1.3 div día^{-1} , mientras que los porcentajes indicados en todos los trabajos mencionados anteriormente fueron obtenidos en la fase estacionaria. Esto indica que las variaciones en el contenido bioquímico de las moléculas, en este caso del EPS, dependen de la fase de crecimiento además de factores como el medio de cultivo y la especie.

En lo que respecta a la relación de azúcares y sulfatos en el EPS, los monosacáridos que presentan el grupo sulfato son la glucosa, galactosa y xilosa (Lupescu *et al.*, 1991; Mendonça, 2014); sin embargo, no se han encontrado trabajos que confirmen que la cantidad de sulfato depende de la cantidad de estos

monosacáridos. En este trabajo se esperaba ver una interacción entre la cantidad de sulfatos y los monosacáridos de xilosa, glucosa y galactosa. Sin embargo, a pesar de que se presentó una variación en la cantidad de los tres monosacáridos en el día 4 de cultivo, los sulfatos se mantuvieron en la misma cantidad durante todo el cultivo, por lo que, se sugiere realizar más estudios que puedan ampliar el conocimiento sobre la interacción entre los azúcares del EPS y el grupo sulfato, así como también la relación que existe entre la composición bioquímica del EPS respecto a la fase de crecimiento de la microalga.

Además, se han descrito numerosos estudios donde mencionan que el perfil de azúcares en el EPS es similar entre el género *Porphyridium* y otras algas rojas (Geresh y Arad, 1991; Cohen y Arad, 1998; Li *et al.*, 2000; Bouhlal *et al.*, 2011; Raposo *et al.*, 2014; Soanen *et al.*, 2016 Medina-Cabrera *et al.*, 2020 Gargouch *et al.*, 2021). Sin embargo, la estructura bioquímica del EPS es diferente entre las especies, ya que se ha reportado que el EPS de *Porphyridium* sp. fue degradado por enzimas extracelulares de un grupo de bacterias de suelo, mientras que estas mismas enzimas no pudieron degradar el EPS sulfatado de otras algas rojas, entre ellas *Rhodella reticulata* (Arad *et al.*, 1993). No obstante, las bacterias asociadas al cultivo de *R. reticulata*, utilizaron el EPS como fuente de energía (Panova-Toncheva y Ivanova, 1997). Estos resultados toman gran relevancia al momento de explicar porque no hubo un efecto antimicrobiano en el presente trabajo. Para complementar esta información, en el trabajo de Gargouch *et al.* (2021) observaron inhibición de *E. coli* al exponerla al EPS producido por *P. marinum*, mientras que en el trabajo de Raposo *et al.* (2014) los autores no encontraron un efecto antimicrobiano del EPS producido por *P. cruentum* sobre la bacteria *E. coli*. Este contraste en los resultados podría atribuirse a las diferencias entre las estructuras del EPS de *P. marinum* y *P. cruentum*. Por otro lado, no se han reportado estudios sobre la inhibición de la bacteria *V. harveyi* al ser expuesta al EPS producido por el género *Porphyridium*.

Como se describió anteriormente, el éxito de las bacterias para metabolizar el EPS dependerá de la estructura de éste, por lo tanto, un efecto similar podría estar pasando con el efecto antimicrobiano de del EPS de *P. cruentum* sobre las bacterias *E. coli* y *V. harveyi*. En adición, se ha mencionado que la actividad biológica (antioxidante, antiviral, antimicrobiana) de EPS depende en gran medida de la estructura bioquímica de los carbohidratos, la masa molecular, posición de los grupos sulfatos y cantidad o grado de sulfatación (Wang *et al.*, 2018). Sin embargo, en el presente trabajo, también se consideran los errores metodológicos que pudieron influir en los resultados, por ejemplo, quizá las concentraciones del EPS fueron subestimadas o también, la metodología de difusión en placa para las pruebas de sensibilidad pudo no haber sido las adecuadas para esta investigación, ya que, como se menciona en el trabajo de Amorim *et al.* (2012) la viscosidad del EPS dificulta la difusión del EPS en el medio de cultivo sólido. Por lo tanto, se recomienda realizar la prueba de sensibilidad en medio líquido como en el trabajo de Raposo *et al.* (2014).

Song *et al.* (2014), obtuvieron resultados que revelan la mecánica anti adhesiva de los EPS ante las bacterias, ya que en su ensayo observaron que el grupo sulfato del EPS compitió contra las bacterias de *Helicobacter pylori* por sitios de adhesión en las células diana, dando como resultado una reducción en la población de bacterias sobre células AGS (células de epitelio gastrointestinal humano) y eritrocitos. El efecto antiadhesivo se observó potencializado cuando el EPS presentó mayor cantidad de galactosa con el grupo sulfato.

A pesar de los resultados obtenidos en el presente trabajo, en donde aparentemente el EPS producido por la microalga *P. cruentum* no tiene un efecto inhibitorio ante las bacterias *V. harveyi* y *E. coli*, bajo las condiciones adoptadas en este bioensayo, otros estudios demuestran que esta microalga contiene la capacidad de inhibir una gran variedad de bacterias incluyendo el género *Vibrio*. Por ejemplo, se ha observado que compuestos bioquímicos de *P. cruentum* extraídos a base de disolventes orgánicos (hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol) son capaces de inhibir a las bacterias *V. splendidus*, *V. harveyi*, *A. hydrophilia*, *Vibrio* sp., entre otras, a concentraciones de 5 mg ml⁻¹ (Saracco-Alvarez, 2007). Así mismo, en otros estudios también se ha registrado que el extracto de *P. cruentum* no genera inhibición de distintas bacterias, entre ellas, *E. coli*, cuando el extracto es extraído con etanol, pero, sí produce un halo de inhibición de 9 mm en la bacteria *E. coli* cuando el extracto es obtenido con hexano y en concentración de 1.5 mg ml⁻¹ (Yilmaz *et al.*, 2017). Estos autores, indican que el extracto que tiene en su mayoría compuestos fenólicos, pero que la actividad antimicrobiana podría estar surgiendo de una sinergia entre varias moléculas presentes en el extracto. Además, un estudio realizado por Kusmiyati y Agustini (2006) Indican que el tipo de solvente orgánico utilizado en la obtención del extracto de *P. cruentum* influirá en si hay o no una inhibición en la bacteria *E. coli*.

Las curvas de crecimiento de las bacterias *V. harveyi* y *E. coli* presentaron un comportamiento de crecimiento bifásico. Este fenómeno ocurre cuando el medio de cultivo presenta dos fuentes de carbono y metabolizan primeramente el de menor complejidad (Attwood *et al.*, 1991; Rincón-Santamaría *et al.*, 2019). Para la Bacteria *E. coli* se ha visto con un comportamiento de crecimiento bifásico (Loomis y Magasanik, 1967; Okada *et al.*, 1981; Sun *et al.*, 2020), mientras que para el caso de la bacteria *V. harveyi* no se han encontrado hasta el momento, evidencias de curvas de crecimiento similares a las del presente trabajo, pero si se ha reportado este tipo decrecimiento para *V. cholerae*. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que ocurriera un error al momento de tomar las lecturas en el espectrofotómetro. Por otro lado, aunque es difícil establecer las condiciones óptimas de crecimiento para *V. harveyi* debido a la interacción de varios factores (salinidad, nutrientes temperatura, entre otros), se ha visto que la temperatura del agua es uno de los que más influyen (Cavallo y Stabili, 2002; Zhou *et al.*, 2012). Además,

temperaturas que varían de 20 a 30 °C es donde se presenta la mayor densidad de bacterias tipo *Vibrio* (Tantillo *et al.*, 2004). No obstante, sea reportado como temperatura óptima 26 °C para *V. harveyi* (Montánchez *et al.*, 2019).

En lo que se refiere a la bacteria *E. coli*, se ha visto que en medio LB y temperatura de 25 a 30 °C tiene un crecimiento moderado, mientras que 37 °C es su temperatura óptima (Noor *et al.*, 2013), por lo que la temperatura utilizada en el presente trabajo probablemente no fue la óptima, pero si generó un ambiente aceptable para el crecimiento de la bacteria *E coli*.

Capítulo 5. Conclusiones

No hubo diferencias estadísticamente significativas en la producción de EPS durante las diferentes fases de crecimiento de *P. cruentum*. La cantidad final de EPS fue $2.84 \pm 0.14 \text{ mg ml}^{-1}$. No obstante, si se observó una diferencia significativa en el contenido de azúcares presentes en el EPS. La fase de crecimiento exponencial es donde el porcentaje de azúcares aumenta. Así mismo, también se obtuvo que el contenido de sulfato presente en el EPS no está relacionado a los azúcares ni tampoco a la fase de crecimiento del alga.

El hecho de que el exopolisacárido sulfatado producido por *P. cruentum* no generara inhibición en las bacterias *V. harveyi* y *E. coli* podría deberse a que el EPS producido bajo las condiciones utilizadas en este trabajo no tiene la estructura biológica para generar inhibición de las cepas bacterias utilizadas o que estuviera en una baja concentración, entre otros.

La ausencia de actividad antimicrobiana en este trabajo pudiera estar relacionada con la viscosidad del EPS y su dificultad para difundir en los sensidiscos utilizados en el método de difusión en placa, por lo que en el futuro se sugiere el uso de metodologías en líquido.

Capítulo 6. Recomendaciones

Se sugiere analizar la viscosidad del EPS ya que, una alta viscosidad puede interferir con los resultados en la prueba de sensibilidad con la metodología de difusión en placa, así como lo indica Amorim *et al.* (2012), además de, utilizar concentraciones mayores de EPS y cambiar la metodología de difusión en placa por pruebas de sensibilidad en medio líquido como el trabajo de Raposo *et al.* (2014).

La diálisis del EPS se debe de realizar con una membrana menor a 14 KDa para evitar pérdidas del exopolisacárido. Además, se requiere evaluar la metodología de diálisis empleada para garantizar la ausencia de sales en el EPS. Algunos de los parámetros a evaluar en el proceso de diálisis son: tiempos, volúmenes de agua y temperatura.

Antes de iniciar con las pruebas de sensibilidad del EPS sobre las bacterias, es recomendable realizar los análisis del contenido de sulfatos, azúcares y peso orgánico del EPS, con la finalidad de corroborar la integridad de este.

Se sugiere analizar el perfil del contenido total del EPS de *P. cruentum* mediante técnicas de infrarrojo o espectrometría de masas.

Ampliar el conocimiento del efecto inhibitorio del EPS de *P. cruentum* sobre otras bacterias diferentes al género *Vibrio*, pero de importancia en la industria acuícola.

Literatura citada

- Abdala-Díaz, R. T., Chabrilón, M., Cabello-Pasini, A., López-Soler, B. y Figueroa, F. L. 2010. Efecto de los polisacáridos de *Porphyridium cruentum* sobre la actividad de la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7. *Ciencias Marinas*, 36(4), 345-353. doi: 10.7773/cm.v36i4.1732.
- Aguirre-Guzmán, G., Ruíz, H. M. y Ascencio, F. 2004. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. *Aquaculture Research*, 35(15), 1395-1404. doi: 10.1111/j.1365-2109.2004.01165.x.
- Amaro, H. m., Guedes, C. A. y Malcata, X. F. 2011. Antimicrobial activities of microalgae: an invited review. *Science against microbial pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances, November 2011*, 1272-1280.
- Amorim, R. das N., Rodrigues, J. A. G., Holanda, M. L., Quinderé, A. L. G., de Paula, R. C. M., Melo, V. M. M. y Benevides, N. M. B. 2012. Antimicrobial effect of a crude sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria ornata*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(2), 171-181. doi: 10.1590/S1516-89132012000200001.
- Arad, S. M., Adda, M. y Cohen, E. 1985. The potential of production of sulfated polysaccharides from *Porphyridium*. *Martinus Nijhoff Publishers*, 7, 117-127.
- Arad, S. M., Keristovesky, G., Simon, B., Barak, Z. y Geresh, S. 1993. Biodegradation of the sulfated polysaccharide of *Porphyridium* by soil bacteria. 32(2), 287-290.
- Arad, S. M. y van Moppes, D. 2013. Novel sulfated polysaccharides of red microalgae: Basics and applications. En: A. Richmond y Q. Hu (Eds.), *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition*, John Wiley & Sons, Ltd. 406–416. doi: 10.1002/9781118567166.ch21.
- Arlov, Ø., Rüttsche, D., Asadi Korayem, M., Öztürk, E. y Zenobi-Wong, M. 2021. Engineered sulfated polysaccharides for biomedical applications. *Advanced Functional Materials*, 31(19), 2010732. doi: 10.1002/adfm.202010732.
- Arredondo-Vega, B. O. y Voltolina, D. 2007. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. En: B. O. Arredondo-Vega y Voltolina, D. (Eds.), *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 21-29. <https://www.researchgate.net/publication/253237563>.
- Attwood, M. M., van Dijken, J. P. y Pronk, J. T. 1991. Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 72(2), 101-105. doi: 10.1016/0922-338X(91)90317-A.
- Austin, B. y Austin, D. A. 2007. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish. In *Bacterial Fish Pathogens* (4th ed.). Springer Praxis Publishing, Chichester, United Kingdom. doi: 10.1007/978-1-4020-6069-4_2
- Barattini, P. 2012. Antibióticos en acuicultura. En: C. Hepp (Ed.), *Resultados preliminares sobre el uso de lodos de pisciculturas sobre suelos agropecuarios origen volcánico de la patagonia (AYSÉN)*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro de Investigación INIA Tamel Aike, Coyhaique, Aysén-Patagonia, Chile. Boletín técnico N° 223. Imprenta América (Temuco). 82.
- Barquero, M. S., Jiménez, L. M. C., Jiménez, K. B. y Araya, R. A. 2012. Implementación de dos métodos de recuento en placa para la detección de colifagos somáticos, aportes a las metodologías estándar.

Revista Peruana de Biología, 19(3), 335–340. doi: 10.15381/rpb.v19i3.1050

- Básaca-Loya, G. A., Valdez, M. A., Enríquez-Guevara, E. A., Gutierrez-Millán, L. E. y Burboa, M. G. 2009. Extraction and purification of B-phycoerythrin from the red microalga *Rhodospirillum rubrum*. *Ciencias Marinas*, 35(4), 359-368. doi: 10.7773/cm.v35i4.1614
- Beaz-Hidalgo, R., Balboa, S., Romalde, J. L. y Figueras, M. J. 2010. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environmental Microbiology Reports*, 2(1), 34-43. doi: 10.1111/j.1758-2229.2010.00135.x
- Bernaerts, T. M. M., Kyomugasho, C., Van Looveren, N., Gheysen, L., Foubert, I., Hendrickx, M. E. y Van Loey, A. M. 2018. Molecular and rheological characterization of different cell wall fractions of *Porphyridium cruentum*. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier, 195(February), 542-550. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.05.001
- Blackwell, K. D. y Oliver, J. D. 2008. The ecology of *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus* in North Carolina Estuaries. *Journal of Microbiology*, 46(2), 146-153. doi: 10.1007/s12275-007-0216-2
- Bouhlal, R., Haslin, C., Chermann, J. C., Collic-Jouault, S., Siquin, C., Simon, G., Cerantola, S., Riadi, H. y Bourgougnon, N. 2011. Antiviral activities of sulfated polysaccharides isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta, Gigartinales) and *Boergesenella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales). *Marine Drugs*, 9(7), 1187–1209. doi: 10.3390/md9071187
- Bourgougnon, N., Lahaye, M., Chermann, J.-C. y Kornprobst, J.-M. 1993. Composition and antiviral activities of a sulfated polysaccharide from *Schizymenia dubyi* (Rhodophyta, gigartinales). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 3(6), 1141-1146.
- Casas-Arrojo, V., Decara, J., Arrojo-Agudo, M. de los Á., Pérez-Manríquez, C. y Abdala-Díaz, R. T. 2021. Immunomodulatory, antioxidant activity and cytotoxic effect of sulfated polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. (S.F.Gray) Nägeli. *Biomolecules*, 11(488), 1-21. doi: 10.3390/biom11040488
- Cavaliere, S. J., Harbeck, R. J., McCarter, Y. S., Ortez, J. H., Rankin, I. D., Sautter, R. L., Sharp, S. E. y Spiegel, C. A. 2005. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. En: M. B. Coyle (Ed.), *Library of Congress Cataloging*. <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>
- Cavallo, R. A. y Stabili, L. 2002. Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). *Water Research*, 36(15), 3719-3726. doi: 10.1016/S0043-1354(02)00107-0
- Chen, F. R., Liu, P. C. y Lee, K. K. 2000. Lethal attribute of serine protease secreted by *Vibrio alginolyticus* strains in kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 55(1–2), 94-99. doi: 10.1515/znc-2000-1-218
- Cohen, A. (Katz) y Arad, S. (Malis). 1998. Biosynthesis of the cell wall polysaccharide in the red microalga *Rhodella reticulata*. *Israel Journal of Plant Sciences*, 46(2), 147-153. doi: 10.1080/07929978.1998.10676722
- Cohen, Z. 1990. The production potential of eicosapentaenoic and arachidonic acids by the red alga *Porphyridium cruentum*. *JAOCS*, 67(12), 916-920.
- Collaborators Antimicrobial Resistance (130 autores). 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*, 399(10325), 629-655. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0

- Craigie, J.S., y Leigh, C. 1978. Carrageenans and agars. En: J. A. Hellebust y J.S. Craigie (Eds.), Handbook of phycological methods: Physiological and biochemical methods. Cambridge University Press. 109-131.
- Croci, L., Suffredini, E., Cozzi, L., Toti, L., Ottaviani, D., Pruzzo, C., Serratore, P., Fischetti, R., Goffredo, E., Loffredo, G., Mioni, R., Paola, P., Raffaello, L., Mara, P., Masini, L., Zampini, M., Bacciaglia, A., Annamaria, P., Stefania, M., Donatella, B., Silvia, Z., Milioni, C., Gasperetti, L., Giovanna, L. S., Carmine, P., Stefano, S., Di Giamberardino, F., Maria, G. y Claudio, B. 2007. Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Applied Microbiology, 102(1), 229-237. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03046.x
- Cuéllar-Anjel, J. 2013. Vibriosis. The Center for Food Security & Public Health, 1-5. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/vibriosis-in-shrimp-es.pdf>
- Culture Collections. Consultado el 04 de septiembre del 2022, de <https://www.culturecollections.org.uk/technical/cell-culture-protocols/resuscitation-of-frozen-cells.aspx>
- De Schryver, P., Defoirdt, T. y Sorgeloos, P. 2014. Early Mortality Syndrome Outbreaks: A Microbial management issue in shrimp farming? PLoS Pathogens, 10(4), 10-12. doi: 10.1371/journal.ppat.1003919
- De Souza-Valente, C. y Wan, A. H. L. 2021. *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans. Journal of Invertebrate Pathology. Elsevier Inc., 181(May 2020), 107527. doi: 10.1016/j.jip.2020.107527
- Defoirdt, T., Sorgeloos, P. y Bossier, P. 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. Current Opinion in Microbiology, 14(3), 251-258. doi: 10.1016/j.mib.2011.03.004
- Dever, L. A. y Dermody, T. S. 1991. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. Archives of Internal Medicine, 151(5), 886-893. doi: doi:10.1001/archinte.1991.00400050040010
- Durmaz, Y., Donato, M., Monteiro, M., Gouveia, L., Nunes, M. L., Pereira, T. G., Gokpinar, S. y Bandarra, N. M. 2008. Effect of temperature on growth and biochemical composition (sterols, α -tocopherol, carotenoids, fatty acid profiles) of the microalga, *Isochrysis galbana*. Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh, 60(3), 190-197.
- EMA. 2021. Union AMEG Group - composition. European Medicines Agency, June. <https://www.ema.europa.eu/en/committees/working-parties-other-groups/cvmp/antimicrobial-advice-ad-hoc-expert-group-ameg>
- Erkinharju, T., Dalmo, R. A., Hansen, M. y Seternes, T. 2021. Cleaner fish in aquaculture: review on diseases and vaccination. Reviews in Aquaculture, 13(1), 189-237. doi: 10.1111/raq.12470
- Fábregas, J., García, D., Fernández-Alonso, M., Rocha, A. I., Gómez-Puertas, P., Escribano, J. M., Otero, A. y Coll, J. M. 1999. In vitro inhibition of the replication of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and African swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae. Antiviral Research, 44(1), 67-73. doi: 10.1016/S0166-3542(99)00049-2
- FAO. Fisheries and Aquaculture Department. 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. <https://www.fao.org/responsible-fishing/resources/detail/es/c/1333729/>
- FAO. Fisheries and Aquaculture Department. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA). La sostenibilidad en acción. Roma, Italia. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>
- Gaikwad, M., Pawar, Y., Nagle, V. y Dasgupta, S. 2020. Marine red alga *Porphyridium* sp. as a source of sulfated polysaccharides (SPs) for combating against COVID-19. Preprints 2020040168.

- García-Bermejo, I. M. 2000. Diagnóstico de las infecciones humanas causadas por especies halófilas del género *Vibrio*. Servicio de Microbiología, Hospital de Getafe, Control Calidad SEIM. 1-6.
- García-Triana, A. 2005. Identificación de bacterias en cultivo larvario de camarón (*Litopenaeus vannamei*) mediante la técnica de FISH. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Gargouch, N., Elleuch, F., Karkouch, I., Tabbene, O., Pichon, C., Gardarin, C., Rihouey, C., Picton, L., Abdelkafi, S., Fendri, I. y Laroche, C. 2021. Potential of exopolysaccharide from *Porphyridium marinum* to contend with bacterial proliferation, biofilm formation, and breast cancer. *Marine Drugs*, 19(61), 1-19. doi: <https://doi.org/10.3390/md19020066> Academic
- Geresh, S. y Arad, S. 1991. The extracellular polysaccharides of the red microalgae: Chemistry and rheology. *Bioresource Technology*, 38(2), 195-201. doi: [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90154-C](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90154-C)
- Ghosh, T., Chattopadhyay, K., Marschall, M., Karmakar, P., Mandal, P. y Ray, B. 2009. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: From structure-activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology*, 19(1), 2-15. doi: 10.1093/glycob/cwn092
- Gómez-Gil, B., Tron-Mayén, L., Roque, A., Turnbull, J. F., Inglis, V. y Guerra-Flores, A. L. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 163(1-2), 1-9. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00162-8
- González, M. E., Alarcón, B. y Carrasco, L. 1987. Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31(9), 1388-1393. doi: 10.1128/AAC.31.9.1388
- Guillard, R.R.L. y Ryther, J.W. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detanula confervacea* Cleve. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2): 229-239.
- Gutiérrez-Jiménez, J., Luna-Cazás, L. M., Mendoza-Orozco, M. I., Díaz-Marina, G. de J., Burguete-Gutiérrez, J. y Feliciano-Guzmán, J. M. 2015. Organization, maintenance, and preservation of the Bacterial Culture Collection of the Biological Sciences Institute, University of Science and Arts of Chiapas (UNICACH), Mexico. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35(2), 95-102.
- Hamed, I. 2016. The evolution and versatility of microalgal biotechnology: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 1104-1123. doi: 10.1111/1541-4337.12227
- Hernandez-Garibay, E. 2011. Caracterización de polisacáridos sulfatados no galactanos de algas marinas y factores que influencian su composición. Tesis de Doctorado en Ciencias en Oceanografía Costera. Universidad Autónoma de Baja California. 91.
- Huheihe, M., Ishanu, V., Tal, J. y Arad, S. (Malis). 2002. Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 50(2), 189-200. doi: [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00186-5](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00186-5)
- Kokou, F., Makridis, P., Kentouri, M. y Divanach, P. 2012. Antibacterial activity in microalgae cultures. *Aquaculture Research*, 43(10), 1520-1527. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.02955.x
- Kusmiyati, K. y Agustini, N. W. S. 2006. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Biodiversitas*, 8, 48-53.
- Labreuche, Y., Le Roux, F., Henry, J., Zatylny, C., Huvet, A., Lambert, C., Soudant, P., Mazel, D. y Nicolas, J. L. 2010. *Vibrio aestuarianus* zinc metalloprotease causes lethality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and impairs the host cellular immune defenses. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(5), 753-758.

doi: 10.1016/j.fsi.2010.07.007

- Lauritano, C., Andersen, J. H., Hansen, E., Albrigtsen, M., Escalera, L., Esposito, F., Helland, K., Hanssen, K., Romano, G. y Lanora, A. 2016. Bioactivity screening of microalgae for antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, anti-diabetes, and antibacterial activities. *Frontiers in Marine Science*, 3(68), 1-12. doi: 10.3389/fmars.2016.00068
- Li, S., Ji, L., Shi, Q., Wu, H. y Fan, J. 2019. Advances in the production of bioactive substances from marine unicellular microalgae *Porphyridium* spp. *Bioresource Technology*. Elsevier, 292(August), 122048. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122048
- Li, S., Shabtai, Y. y Arad, S. M. 2000. Production and composition of the sulphated cell wall polysaccharide of *Porphyridium* (Rhodophyta) as affected by CO₂ concentration. *Phycologia*, 39(4), 332-336. doi: 10.2216/i0031-8884-39-4-332.1
- Liu, L., Pohnert, G. y Wei, D. 2016. Extracellular metabolites from industrial microalgae and their biotechnological potential. *Marine Drugs*, 14(10), 1-19. doi: 10.3390/md14100191
- Loomis, W. F. y Magasanik, B. 1967. Glucose-Lactose Diauxie. *Microbiology*, 93(4), 1397-1401.
- Lupescu, N., Arad, S. (Malis), Geresh, S., Bernstein, M. A. y Glaser, R. 1991. Structure of some sulfated sugars isolated after acid hydrolysis of the extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp., a unicellular red alga. *Carbohydrate Research*, 210, 349-352. doi: 10.1016/0008-6215(91)80136-B
- Manage, P. M. 2018. Heavy use of antibiotics in aquaculture: Emerging human and animal health problems – A review. *Sri Lanka Journal of Aquatic Sciences*, 23(1), 3-13. doi: 10.4038/sljas.v23i1.7543
- Medina-Cabrera, E. V., Rühmann, B., Schmid, J. y Sieber, V. 2020. Characterization and comparison of *Porphyridium sordidum* and *Porphyridium purpureum* concerning growth characteristics and polysaccharide production. *Algal Research*, 49, 101931. doi: 10.1016/j.algal.2020.101931
- Medina-Jasso, A., Piña-Valdez, P., Nieves-Soto, M., Arzola-González, J. F. y Guerrero-Ibarra, M. 2012. La importancia de las microalgas. *CONABIO. Biodiversitas*, 103:1-5.
- Mendonça, V. I. 2014. Effect of salinity on the production of exopolysaccharides by microalgae *Porphyridium cruentum*. DEQ-IST – Departamento de Engenharia Química, Instituto Superior Técnico Lisboa, 1-10.
- Minkova, K., Michailov, Y., Tonheva-Panova, T. y Houbavenska, N. 1966. Antiviral activity of *Porphyridium cruentum* polysaccharide. *Pharmazie*, 51(3), 228.
- Moniruzzaman, M. 2018. Bacterial calibration curve using OD and CFU /ml Protocol : Making of bacterial calibration curve using OD and CFU / ml. Issue February.
- Montánchez, I., Ogayar, E., Plágaro, A. H., Esteve-Codina, A., Gómez-Garrido, J., Orruño, M., Arana, I. y Kaberdin, V. R. 2019. Analysis of *Vibrio harveyi* adaptation in sea water microcosms at elevated temperature provides insights into the putative mechanisms of its persistence and spread in the time of global warming. *Scientific Reports*, 9(1), 1-12. doi: 10.1038/s41598-018-36483-0
- Moreno, C., González, R. y Beltrán, C. 2009. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, 69(2), 185-192. doi: 10.4067/s0718-48162009000200014
- Morris, G. J. y Black, R. E. 1985. Cholera and other vibrioses in the United States. *The New England Journal of Medicine*, 312(6), 343-350. doi: 10.1056/NEJM198502073120604
- Noor, R., Islam, Z., Munshi, S. K. y Rahman, F. 2013. Influence of temperature on *Escherichia coli* growth in

- different culture media. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 7(2), 899-904.
- OIE. 2016. Estrategia de la OIE sobre la resistencia a los agentes antimicrobianos y su uso prudente. 12. https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media_Center/docs/pdf/PortalAMR/ES_OIE-AMRstrategy.pdf
- Okada, T., Ueyama, K., Niiya, S., Kanazawa, H., Futai, M. y Tsuchiya, T. 1981. Role of inducer exclusion in preferential utilization of glucose over melibiose in diauxic growth of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 146(3), 1030-1037. doi: 10.1128/jb.146.3.1030-1037.1981
- OMS. 2016. Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland, 1-23.
- Palanisamy, S., Vinosha, M., Marudhupandi, T., Rajasekar, P. y Prabhu, N. M. 2017. In vitro antioxidant and antibacterial activity of sulfated polysaccharides isolated from *Spatoglossum asperum*. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd., 170, 296-304. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.04.085
- Panova-Toncheva, T. y Ivanova, J. 1997. A bacterial pathogen of *Rhodella reticulata*. *Applied Microbiology*, 83, 707-711.
- Parolis, H., Parolis, L. A. S., Boán, I. F., Rodríguez-Valera, F., Widmalm, G., Manca, M. C., Jansson, P. E. y Sutherland, I. W. 1996. The structure of the exopolysaccharide produced by the halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei* strain R4 (ATCC 33500). *Carbohydrate Research*, 295(96), 147-156. doi: 10.1016/S0008-6215(96)00219-4
- Pérez-Cano, H. y Robles-Contreras, A. 2013. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica*, 4(04), 186-191. <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2013/md133i.pdf>
- Pérez-Sánchez, T., Mora-Sánchez, B. y Balcázar, J. L. 2018. Biological approaches for disease control in aquaculture: Advantages, Limitations and Challenges. *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, 26(11), 896-903. doi: 10.1016/j.tim.2018.05.002
- Pratoomyot, J., Srivilas, P. y Noiraksar, T. 2005. Fatty acids composition of 10 microalgal species. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27(6), 308-314.
- Pridgeon, J. W. y Klesius, P. H. 2012. Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 7(048), 3. doi: 10.1079/PAVSNNR20127048
- Priyanka, P., Arun, A. B. y Rekha, P. D. 2014. Sulfated exopolysaccharide produced by *Labrenzia* sp. PRIM-30, characterization and prospective applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 69, 290-295. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.05.054
- Pujol, C. A., Ray, S., Ray, B. y Damonte, E. B. 2012. Antiviral activity against dengue virus of diverse classes of algal sulfated polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 51(4), 412-416. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.05.028
- Rain-Franco, A., de Moraes, G. P. y Beier, S. 2021. Cryopreservation and resuscitation of natural aquatic prokaryotic communities. *Frontiers in Microbiology*, 11(January), 1-19. doi: 10.3389/fmicb.2020.597653
- Ramus, J. y Groves, S. T. 1972. Incorporation of sulfate of the into the capsular polysaccharide of the red alga *Porphyridium*. *The Journal of Cell Biology*, 54, 399-407.
- Raposo, M. F. J., De Moraes, R. M. S. C. y De Moraes, A. M. M. B. 2013. Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. *Marine Drugs*, 11(1), 233-252. doi:

10.3390/md11010233

- Raposo, M. F. J., De Morais, A. M. M. B. y De Morais, R. M. S. C. 2014. Influence of sulphate on the composition and antibacterial and antiviral properties of the exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum*. Life Sciences. Elsevier Inc., 101(1-2), 56–63. doi: 10.1016/j.lfs.2014.02.013
- Reverter, M., Sarter, S., Caruso, D., Avarre, J. C., Combe, M., Pepey, E., Pouyaud, L., Vega-Heredía, S., de Verdal, H. y Gozlan, R. E. 2020. Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance. Nature Communications. Springer US, 11(1), 1-8. doi: 10.1038/s41467-020-15735-6
- Rincón-Santamaría, A., Cuellar-Gil, J. A., Valencia-Gil, L. F. y Sánchez-Toro, O. J. 2019. Kinetics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* growth using cane molasses and sucrose: assessment of kinetic models. Acta Biologica Colombiana, 24(1), 38–57. doi: 10.15446/abc.v24n1.70857
- Roussel, M., Villay, A., Delbac, F., Michaud, P., Laroche, C., Roriz, D., El Alaoui, H. y Diogon, M. 2015. Antimicrosporidian activity of sulphated polysaccharides from algae and their potential to control honeybee nosemosis. Carbohydrate Polymers. Elsevier Ltd., 133, 213-220. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.07.022
- Sacsquispe-Contreras, R. E. y Velásquez-Pomar, J. 2002. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Minisiterio de Salud Del Perú, 67. <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>
- Santiago, M. L., Espinosa, A. y Bermúdez, M. D. C. 2009. Uso de antibióticos en la camaronicultura. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 40(3), 22-32.
- Saracco-Alvarez, M. del R. 2007. Compuestos con actividad antibacterial producidos por las microalgas. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/1142>
- Saulnier, D., de Decker, S., Haffner, P., Cobret, L., Robert, M. y García, C. 2010. A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. Microbial Ecology, 59(4), 787-798. doi: 10.1007/s00248-009-9620-y
- Seija, V. y Vignoli, R. 2006. Principales grupos de antibióticos. Temas de Bacteriología y Virología Médica, 631-633. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf>
- Sirakov, I., Velichkova, K., Stoyanova, S. y Staykov, Y. 2015. The importance of microalgae for aquaculture industry. Review. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, 2(4), 81-84. <http://www.fisheriesjournal.com/archives/2015/vol2issue4/PartB/2-4-31.pdf>
- Sivagnanavelmurugan, M., Karthik Ramnath, G., Jude Thaddaeus, B., Palavesam, A. y Immanuel, G. 2015. Effect of *Sargassum wightii* fucoïdan on growth and disease resistance to *Vibrio parahaemolyticus* in *Penaeus monodon* post-larvae. Aquaculture Nutrition, 21(6), 960-969. doi: 10.1111/anu.12217
- Sivagnanavelmurugan, M., Marudhupandi, T., Palavesam, A. y Immanuel, G. 2012. Antiviral effect of fucoïdan extracted from the brown seaweed, *Sargassum wightii*, on shrimp *Penaeus monodon* postlarvae against white spot syndrome virus. Journal of the World Aquaculture Society, 43(5), 697-706. doi: 10.1111/j.1749-7345.2012.00596.x
- Soanen, N., Da Silva, E., Gardarin, C., Michaud, P. y Laroche, C. 2016. Improvement of exopolysaccharide production by *Porphyridium marinum*. Bioresource Technology. Elsevier Ltd, 213, 231-238. doi: 10.1016/j.biortech.2016.02.075

- Song, W., Wang, Y., Zhang, L., Fu, S., Zeng, Y. y Hu, H. 2014. Preparation and evaluation of polysaccharide sulfates for inhibiting *Helicobacter pylori* adhesion. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd., 103(1), 398-404. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.12.063
- Sugumar, G., Nakai, T., Hirata, Y., Matsubara, D. y Muroga, K. 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 33(2), 111-118. doi: 10.3354/dao033111
- Sun, H., Zhang, X., Wang, D. y Lin, Z. 2020. Insights into the role of energy source in hormesis through diauxic growth of bacteria in mixed cultivation systems. *Chemosphere*. Elsevier Ltd, 261, 127669. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.127669
- Tantillo, G. M., Fontanarosa, M., Di Pinto, A. y Musti, M. 2004. Updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections. *Letters in Applied Microbiology*, 39(2), 117-126. doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01568.x
- Thompson, F. L., Austin, B. y Swings, J. 2006. *The Biology of Vibrios*. ASM Press. 251-297.
- Trejo-Ramos, D. A. 2019. Histología sistémica de larvas y juveniles de *Totoaba macdonaldi* y su respuesta ante un evento de vibriosis. Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 101.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. y Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 655-671. doi: 10.1128/mubr.64.4.655-671.2000
- Vignesh, R., Karthikeyan, B., Periyasamy, N. y Devanathan, K. 2011. Antibiotics in aquaculture: An Overview. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 1(3), 114-120-120.
- Wang, Z., Xie, J., Shen, M., Nie, S. y Xie, M. 2018. Sulfated modification of polysaccharides: synthesis, characterization and bioactivities. *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, 74, 147-157. doi: 10.1016/j.tifs.2018.02.010
- WHO. 2017. WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 68.
- Yanong, R. P. E. y Erlacher-Reid, C. 2012. Biosecurity in Aquaculture, Part 1: An Overview. Southern Regional Aquaculture Centre, 4707, 1-16. <https://srac.tamu.edu>
- Yap, P. Y. y Trau, D. 2019. Direct *E. coli* cell count at OD600. *Tip Biosystems*, 102, 1-3.
- Yilmaz, F. F., Demirel, Z., Karabay-yavasoglu, N. U., Ozdemir, G. y Conk-dalay, M. 2017. Antimicrobial and antioxidant activities of *Porphyridium cruentum*. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy* 37(1), 1-8.
- Yim, J. H., Kim, S. J., Ahn, S. H., Lee, C. K., Rhie, K. T. y Lee, H. K. 2004. Antiviral effects of sulfated exopolysaccharide from the marine microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03. *Marine Biotechnology*, 6(1), 17-25. doi: 10.1007/s10126-003-0002-z
- Zhang, X.-H. y Austin, B. 2000. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *Journal of Fish Diseases*, 23(2), 93-102. doi: 10.1046/j.1365-2761.2000.00214.x
- Zhang, X.-H., He, X. y Austin, B. 2020. *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. *Marine Life Science & Technology*. Springer Singapore, 2(3), 231-245. doi: 10.1007/s42995-020-00037-z
- Zhou, K., Gui, M., Li, P., Xing, S., Cui, T. y Peng, Z. 2012. Effect of combined function of temperature and

water activity on the growth of *Vibrio harveyi*. Brazilian Journal of Microbiology, 1365-1375.

Anexo

Anexo 1. Referencia de página de internet para calcular la densidad celular de *E. coli* respecto a su absorbancia a 600nm.

<https://www.agilent.com/store/biocalculators/calcODBacterial.jsp?requestid=712618>

***E. coli* Cell Culture Concentration from OD₆₀₀ Calculator**

Calculator to give the concentration of *E. coli* cell cultures based on spectrophotometer readings at OD₆₀₀.

OD₆₀₀ of 1.0 = 8×10^8 cells/ml.

Bacterial cells/mL =

This calculator uses the extinction coefficients for *E. coli* and Yeast cultures to calculate the cell concentrations from the Optical Density (OD₆₀₀) reading taken with a spectrophotometer.

For bacterial cell cultures OD₆₀₀ of 1.0 = 8×10^8 cells/ml.

Figura 15. Calculadora de unidades formadoras de colonias de *E. coli* respecto a su densidad óptica.