

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@ 2023. Todos los derechos reservados

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



---

**Maestría en Ciencias  
en Ciencias de la Vida  
con orientación en Biotecnología Marina**

---

**Efecto inhibitorio de diatomeas contra bacterias patógenas del  
género *Vibrio* en acuicultura**

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

Presenta:

**Alfredo Castellanos Ibarra**

Ensenada, Baja California, México  
2023

Tesis defendida por  
**Alfredo Castellanos Ibarra**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra**  
Directora de tesis

**Dra. Ceres Anabel Molina Cárdenas**

**Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez**

**Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida**



---

**Dra. Ana Denise Re Araujo**  
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

---

**Dr. Pedro Negrete Regagnon**  
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Alfredo Castellanos Ibarra** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina

### **Efecto inhibitorio de diatomeas contra bacterias patógenas del género *Vibrio* en acuicultura**

Resumen aprobado por:

---

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra  
**Directora de tesis**

La piscicultura, una actividad de producción primaria se ve afectada por bacterias patógenas, principalmente del género *Vibrio*, causante de vibriosis, una enfermedad prevalente en los cultivos piscícolas. El uso de antibióticos es el principal método para controlar la vibriosis y se buscan medios de biocontrol naturales, siendo las microalgas un candidato potencial. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la capacidad inhibitoria de las diatomeas *Navicula incerta* y *Nitzschia laevis* para su potencial uso contra bacterias patógenas (*Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus*). En el reto con *N. incerta* y *V. alginolyticus*, los niveles de *Vibrio* detectados a las 96 h fueron de 30 *V. alginolyticus*/mL y a las 192 h fue <4 *V. alginolyticus*/mL. El peso seco total (PST), peso seco orgánico (PSO) y contenido de cenizas no presentaron diferencias significativas por la adición de *V. alginolyticus*. El contenido de clorofila a, aumentó por la adición de *V. alginolyticus* y no se presentaron diferencias en la clorofila c y carotenoides. Para *N. incerta* y *V. harveyi*, se detectaron niveles  $\leq 0.1$  *V. harveyi*/mL a las 48 h y se mantuvieron hasta las 144 h. El PST, PSO y contenido de cenizas disminuyeron por la adición de *V. harveyi* respecto a lo obtenido en *N. incerta*. La composición de ácidos grasos de *N. incerta* no presentó cambios por la adición de *V. alginolyticus* y *V. harveyi*. En el reto de inhibición con *N. laevis* y *V. alginolyticus*, se lograron niveles  $\leq 0.1$  *V. alginolyticus*/mL a las 96, mientras que a las 168 h fue  $\leq 15$  *V. alginolyticus*/mL. En el reto de *N. laevis* y *V. harveyi*, la inhibición total se presentó a las 96 h y se mantuvo en valores menores a 0.1 *V. harveyi*/mL hasta las 168 h. El PST aumentó por la adición de *V. alginolyticus* y se dio una disminución por la adición de *V. harveyi*. La composición de ácidos grasos de *N. laevis* no presentó cambios significativos por la adición de ambas especies de vibrios. Los retos realizados con las dos especies de diatomeas (*N. laevis* y *N. incerta*) demuestran el potencial inhibitorio contra *V. alginolyticus* y *V. harveyi*.

**Palabras clave:** efecto inhibitorio, vibriosis, piscicultura, diatomeas, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi*.

Abstract of the thesis presented by **Alfredo Castellanos Ibarra** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology

### **Inhibitory effect of diatoms against pathogenic bacteria of the genus *Vibrio* in aquaculture**

Abstract approved by:

---

PhD. M. del Pilar Sánchez Saavedra  
**Thesis Director**

Fish farming, a primary production activity, is affected by pathogenic bacteria, mainly of the genus *Vibrio*, which causes vibriosis, a prevalent disease in fish farming. Antibiotics are the usual method for vibriosis control, and natural biocontrol means are being investigated, microalgae being a potential candidate. This work aimed to evaluate the inhibitory capacity of the diatoms *Navicula incerta* and *Nitzschia laevis* for their potential use against pathogenic bacteria (*Vibrio harveyi* and *Vibrio alginolyticus*). In the challenge with *N. incerta* and *V. alginolyticus*, vibrio levels detected at 96 h were 30 *V. alginolyticus*/mL, and at 192 h it was <4 *V. alginolyticus*/mL. The total dry weight (PST), organic dry weight (PSO) and ash content did not show significant differences due to adding *V. alginolyticus*. The content of chlorophyll a, increased by adding *V. alginolyticus* and there were no differences in chlorophyll c, and carotenoids. For *N. incerta* and *V. harveyi*, levels  $\leq 0.1$  *V. harveyi*/mL were detected at 48 h and were maintained up to 144 h. The PST, PSO and ash content decreased by adding *V. harveyi* compared to that obtained in *N. incerta*. The fatty acid composition of *N. incerta* did not show changes due to the addition of *V. alginolyticus* and *V. harveyi*. In the inhibition challenge with *N. laevis* and *V. alginolyticus*, levels  $\leq 0.1$  *V. alginolyticus*/mL were achieved at 96 h, while at 168 h it was  $\leq 15$  *V. alginolyticus*/mL. In the *N. laevis* and *V. harveyi* challenge, total inhibition occurred at 96 h, and remained at values below 0.1 *V. harveyi*/mL up to 168 h. The PST was increased by the addition of *V. alginolyticus* and decreased by the addition of *V. harveyi*. The fatty acid composition of *N. laevis* did not show significant modifications by adding both vibrios species. The challenges carried out with the two diatom species (*N. laevis* and *N. incerta*) demonstrate the inhibitory potential against *V. alginolyticus* and *V. harveyi*.

**Keywords:** inhibitory effect, vibriosis, fish farming, diatoms, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi*.

## **Dedicatoria**

A mis padres, por darme la vida, por siempre motivarme a hacer las cosas que deseo y por estar ahí en los momentos difíciles.

A mis hermanas, por su apoyo incondicional y por tantos gratos momentos vividos juntos.

A mi novia Isabel Rodríguez Vargas, por todos los momentos vividos, por motivarme a ser un mejor hombre y superarme en todas las áreas de mi vida, por permitirme entrar a tu vida y hacerme extremadamente feliz.

A la Familia Ibarra González por su invaluable apoyo durante mi estancia en Ensenada, por todas las vivencias y momentos compartidos.

## Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica de Educación Superior de Ensenada, Baja California por permitirme realizar mis estudios de maestría en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina en la institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para realizar mis estudios de posgrado, con el número de becario: 958795.

A la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra por aceptarme en su grupo de investigación y su apoyo incondicional, tanto en el ámbito académico como en el personal.

A los miembros de mi comité de tesis Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida por sus consejos, observaciones, facilidades para trabajar en el laboratorio a su cargo y la donación de unas cepas de *Vibrio*. A la Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez por sus comentarios para enriquecer este trabajo y por haber aceptado ser parte del proyecto. A la Dra. Ceres Anabel Molina Cárdenas por su apoyo, paciencia, por compartirme su conocimiento y capacitarme durante la realización de los experimentos.

A la Dra. Edna Sánchez Castrejón por su apertura y disposición durante el tiempo que estuve trabajando en el laboratorio de organismos patógenos, además de mantener y facilitar las cepas de *Vibrio* de la colección del Dr. Lizárraga Partida.

Al Dr. Juan Pablo Lazo Corvera por permitirme el uso del cromatógrafo de gases para la evaluación de los perfiles de ácidos grasos. Además, por facilitarme el acceso al laboratorio de nutrición acuícola durante el periodo que estuve realizando los cultivos bacterianos.

A la Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez por su apoyo al facilitarme una incubadora para el mantenimiento de los cultivos bacterianos y por compartir su conocimiento en la clase de Biología Celular y Molecular.

A la Dra. Olga Alicia Callejas Negrete por facilitarme los materiales para la tinción de bacterias. Al Biol. Abraham Asahel Gasca Venegas por apoyarme e instruirme en la tinción de Gram.

A la M. en C. Fátima Castro Ochoa, por apoyarme en la realización de la parte experimental de la tesis y por sus consejos.

A todos mis compañeros de laboratorio de Biotecnología de Algas (BIOAL), Ulises, Lupita, Ana Karen, Armando, Noelia, Yuhnuen por los momentos vividos juntos, por su apoyo durante el trabajo y amistad.

A mis profesores del posgrado por sus enseñanzas, por compartir su conocimiento y apoyarme a ser un mejor estudiante.

A Helen López Utrera por su invaluable apoyo y consejos, además de las salidas a campo en las Unidades de Producción Acuícola y Sociedades Cooperativas de Producción Pesquera en las tierras de Jalisco, así como por las charlas sobre ciencia y acuicultura.

A mi compañero de casa Abraham Gasca Venegas por las experiencias y momentos vividos, por siempre apoyarme.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	xi
Lista de tablas .....	xv
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes .....	2
1.2 Justificación .....	11
1.3 Hipótesis.....	11
1.4 Objetivos .....	11
1.4.1 Objetivo general.....	11
1.4.2 Objetivos específicos.....	11
<b>Capítulo 2. Metodología.....</b>	<b>13</b>
2.1 Estandarización de metodología y selección de organismos.....	13
2.1.1 Obtención de las cepas de microalgas .....	13
2.1.2 Mantenimiento de las cepas y cultivos de microalgas.....	13
2.1.3 Evaluación del crecimiento de las microalgas.....	14
2.1.4 Cultivo de <i>Vibrio</i> .....	14
2.1.5 Preparación del inóculo bacteriano .....	15
2.1.5.1 Controles experimentales para evaluar la presencia o ausencia de <i>Vibrio</i> spp.....	16
2.1.6 Conteo de bacterias heterotróficas .....	17

2.1.7	Estandarización del crecimiento de <i>V. alginolyticus</i> (ATCC 17749/CICESE 04).....	17
2.1.7.1	Tinción de Gram <i>V. alginolyticus</i> (ATCC 17749/CICESE 04).....	17
2.1.8	Obtención de cepas del “Collection of Aquatic Important Microorganisms” (CAIM) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Mazatlán .....	18
2.1.8.1	Estandarización del suero fisiológico para el crecimiento de <i>V. alginolyticus</i> (ATCC 17749/CAIM 516) y <i>V. anguillarum</i> (CAIM 8).....	18
2.2	Experimentación final .....	19
2.2.1	Retos de inhibición del crecimiento de <i>Vibrio</i> .....	19
2.2.2	Evaluación del peso seco de <i>N. incerta</i> y <i>N. laevis</i> .....	20
2.2.3	Composición proximal de <i>N. incerta</i> y <i>N. laevis</i> .....	21
2.2.3.1	Contenido de lípidos .....	21
2.2.3.2	Contenido de carbohidratos .....	21
2.2.3.3	Contenido de proteínas.....	21
2.2.4	Composición de ácidos grasos .....	21
2.2.5	Extracción y cuantificación de pigmentos.....	22
2.2.6	Tratamiento estadístico de los resultados .....	22
<b>Capítulo 3.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>24</b>
3.1	Estandarización de metodología y selección de organismos.....	24
3.1.1	Reto de inhibición del crecimiento de <i>V. anguillarum</i> (ATCC 19264/CICESE 06).....	24
3.1.2	Caracterización de la curva de crecimiento de <i>N. incerta</i> .....	25
3.1.3	Inhibición del crecimiento de <i>V. alginolyticus</i> (ATCC 17749/CICESE 04) y <i>V. harveyi</i> (DN 01/CICESE 597) por <i>N. incerta</i> .....	27
3.1.3.1	Efecto inhibitorio de <i>N. incerta</i> contra <i>V. alginolyticus</i> (ATCC 17749/CICESE 04) .....	27
3.1.3.2	Estandarización del crecimiento de <i>V. alginolyticus</i> (ATCC 17749/CICESE 04).....	28
3.1.3.3	Tinción de Gram <i>V. alginolyticus</i> (ATCC 17749/CICESE 04).....	28
3.1.3.4	Efecto inhibitorio de <i>N. incerta</i> contra <i>V. harveyi</i> (DN 01/CICESE 597) .....	28

3.1.3.5	Estandarización del suero fisiológico para el crecimiento de <i>V. alginolyticus</i> (ATCC 17749/CAIM 516) y <i>V. anguillarum</i> (CAIM 8).....	29
3.2	Experimentación final .....	31
3.2.1	Inhibición del crecimiento de <i>V. alginolyticus</i> (ATCC 17749/CAIM 516) por <i>N. incerta</i> ...	31
3.2.1.1	Crecimiento de <i>N. incerta</i> en cocultivo con <i>V. alginolyticus</i> (ATCC 17749/CAIM 516).	31
3.2.1.2	Efecto inhibitorio de <i>N. incerta</i> contra <i>V. alginolyticus</i> (ATCC 17749/CAIM 516) .....	32
3.2.1.3	Peso seco total, contenido de cenizas y peso seco orgánico de <i>N. incerta</i> .....	33
3.2.1.4	Composición proximal de <i>N. incerta</i> en cocultivo con <i>V. alginolyticus</i> (ATCC 17749/CAIM 516) .....	34
3.2.1.5	Composición de ácidos grasos de <i>N. incerta</i> .....	35
3.2.1.6	Cuantificación de pigmentos de <i>N. incerta</i> .....	36
3.2.2	Inhibición del crecimiento de <i>V. harveyi</i> (DN 01/CICESE 597) por <i>N. incerta</i> .....	37
3.2.2.1	Crecimiento de <i>N. incerta</i> en cocultivo con <i>V. harveyi</i> (DN 01/CICESE 597) .....	37
3.2.2.2	Efecto inhibitorio de <i>N. incerta</i> contra <i>V. harveyi</i> (DN01/CICESE 597) .....	38
3.2.2.3	Peso seco total, contenido de cenizas y peso seco orgánico de <i>N. incerta</i> .....	39
3.2.2.4	Composición proximal de <i>N. incerta</i> en cocultivo con <i>V. harveyi</i> (DN01/CICESE 597) .	40
3.2.2.5	Composición de ácidos grasos de <i>N. incerta</i> y <i>N. incerta</i> en cocultivo con <i>V. harveyi</i> .	41
3.2.2.6	Cuantificación de pigmentos de <i>N. incerta</i> .....	42
3.2.3	Caracterización de la curva de crecimiento de <i>N. laevis</i> .....	42
3.2.4	Inhibición del crecimiento de <i>V. alginolyticus</i> (ATCC 17749/CAIM 516) por <i>N. laevis</i> .....	44
3.2.4.1	Crecimiento de <i>N. laevis</i> en cocultivo con <i>V. alginolyticus</i> (ATCC 17749/CAIM 516)...	44
3.2.4.2	Efecto inhibitorio de <i>N. laevis</i> contra <i>V. alginolyticus</i> (ATCC 17749/CAIM 516) .....	45
3.2.4.3	Peso seco total, contenido de cenizas y peso seco orgánico de <i>N. laevis</i> .....	46
3.2.4.4	Composición proximal de <i>N. laevis</i> en cocultivo con <i>V. alginolyticus</i> (ATCC 17749/CAIM 516) .....	48
3.2.4.5	Composición de ácidos grasos de <i>N. laevis</i> .....	48
3.2.4.6	Cuantificación de pigmentos de <i>N. laevis</i> .....	49
3.2.5	Inhibición del crecimiento de <i>V. harveyi</i> (DN01/CICESE 597) por <i>N. laevis</i> .....	50

3.2.5.1	Crecimiento de <i>N. laevis</i> en cocultivo con <i>V. harveyi</i> (DN01/CICESE 597).....	50
3.2.5.2	Efecto inhibitorio de <i>N. laevis</i> contra <i>V. harveyi</i> (DN01/CICESE 597) .....	52
3.2.5.3	Peso seco total, contenido de cenizas y peso seco orgánico de <i>N. laevis</i> .....	53
3.2.5.4	Composición proximal de <i>N. laevis</i> en cocultivo con <i>V. harveyi</i> (DN01/CICESE 597) ...	54
3.2.5.5	Composición de ácidos grasos de <i>N. laevis</i> .....	54
3.2.5.6	Cuantificación de pigmentos de <i>N. laevis</i> .....	56
<b>Capítulo 4.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>57</b>
4.1	Experimentación final .....	57
4.1.1	Crecimiento de <i>N. incerta</i> y <i>N. laevis</i> en cocultivo con <i>V. alginolyticus</i> (ATCC17749/CAIM 516) y <i>V. harveyi</i> (DN01/CICESE 597).....	57
4.1.2	Efecto inhibitorio.....	58
4.1.3	Peso seco .....	60
4.1.4	Composición proximal.....	61
4.1.5	Pigmentos.....	63
4.1.6	Composición de ácidos grasos .....	64
<b>Capítulo 5.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>65</b>
<b>Capítulo 6.</b>	<b>Recomendaciones .....</b>	<b>66</b>
<b>Literatura citada .....</b>		<b>67</b>
<b>Anexos.....</b>		<b>72</b>

## Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Lesiones hemorrágicas en la superficie ventral de la lubina europea ( <i>Dicentrarchus labras</i> ) infectada con el serotipo O1 de <i>V. anguillarum</i> . Tomada de Smith (2019).....	4
Figura 2. Lesiones hemorrágicas en la cabeza y las bases de las aletas de una trucha arcoíris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) infectada con <i>V. anguillarum</i> (abajo), comparada con trucha arcoíris sin infección (arriba). Tomada de Smith (2019) .....	4
Figura 3. Reto de inhibición en cocultivo de <i>N. incerta</i> contra <i>V. anguillarum</i> . <i>N. incerta</i> (●), <i>V. anguillarum</i> (■), <i>V. anguillarum</i> en medio "f" (□) y bacterias heterotróficas (▲).....	24
Figura 4. Valores promedio y desviación estándar de la curva de crecimiento de <i>N. incerta</i> , mantenida en cultivos por lote en matraces Erlenmeyer con 100 mL en medio "f". .....	25
Figura 5. Valores promedio y desviación estándar de la curva de crecimiento de <i>N. incerta</i> , evaluada por densidad óptica a 680 nm, mantenida en cultivos por lote en matraces Erlenmeyer con 100 mL en medio "f". .....	26
Figura 6. Valores promedio y desviación estándar del pH medido durante el crecimiento de <i>N. incerta</i> , mantenida en cultivos por lote en matraces Erlenmeyer con 100 mL en medio "f" .....	26
Figura 7. Reto de inhibición de <i>N. incerta</i> contra <i>V. alginolyticus</i> . <i>N. incerta</i> (●), <i>V. alginolyticus</i> (■), <i>V. alginolyticus</i> en medio "f" (□) y bacterias heterotróficas (▲). Filtrado de 10 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). $n=3$ . .....	27
Figura 8. Tinción de Gram de <i>V. alginolyticus</i> (CICESE 04).....	28
Figura 9. Reto de inhibición de <i>N. incerta</i> contra <i>V. harveyi</i> . <i>N. incerta</i> (●), <i>V. harveyi</i> (■), <i>V. harveyi</i> en medio "f" (□) y bacterias heterotróficas (▲). Filtrado de 1 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) $n=3$ .....	29
Figura 10. <i>V. alginolyticus</i> sembrado a las diluciones $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$ y $10^{-5}$ en A) Suero fisiológico preparado 8.9 g NaCl/L de agua destilada y B) Suero fisiológico preparado con 25 g NaCl/L de agua destilada. Resultados a las 120 h. ....	30
Figura 11. <i>V. anguillarum</i> sembrado a las diluciones $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$ y $10^{-5}$ en A) Suero fisiológico preparado 8.9 g NaCl/L de agua destilada y B) Suero fisiológico preparado con 25 g NaCl/L de agua destilada. Resultados a las 0+1 h. ....	30
Figura 12. Curvas de crecimiento de <i>N. incerta</i> . Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de <i>N. incerta</i> en presencia o ausencia de <i>V. alginolyticus</i> . <i>N. incerta</i> (○), <i>N. incerta</i> en cocultivo con <i>V. alginolyticus</i> (●). Se realizó una prueba <i>t</i> de Student para cada tiempo y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) $a>b$ . Valores promedio $\pm$ DE, $n=3$ . ....	31

- Figura 13. Reto de inhibición en cocultivo de *N. incerta* contra *V. alginolyticus*. *N. incerta* (●), *V. alginolyticus* (□), *V. alginolyticus* en medio "f" (■) y bacterias heterotróficas (▲). Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $n=3$ . ..... 32
- Figura 14. Valores de peso seco total, peso seco orgánico y cenizas para *N. incerta*, cocultivo y *V. alginolyticus*. ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $n=3$  ..... 33
- Figura 15. Composición proximal de *N. incerta* y cocultivo. ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha=0.05$ .  $a>b$ .  $n=3$  ..... 34
- Figura 16. Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila a (Chl-a), clorofila c (Chl-c) y carotenoides (car) de *N. incerta* en presencia o ausencia de *V. alginolyticus* al finalizar el reto de inhibición. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para cada grupo de pigmentos. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos:  $a>b$ .  $n=3$ . ..... 36
- Figura 17. Curvas de crecimiento de *N. incerta*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de *N. incerta* en presencia o ausencia de *V. harveyi*. *N. incerta* (○), *N. incerta* en cocultivo con *V. harveyi* (●). Se realizó una prueba *t* de Student para cada tiempo y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ )  $a>b$ . Valores promedio  $\pm$  DE,  $n=3$ . ..... 37
- Figura 18. Reto de inhibición en cocultivo de *N. incerta* contra *V. harveyi*. *N. incerta* (●), *V. harveyi* (□), *V. harveyi* en medio "f" (■) y bacterias heterotróficas (▲). Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $n=3$ . ..... 38
- Figura 19. Valores de peso seco total, peso seco orgánico y cenizas para *N. incerta*, cocultivo y *V. harveyi*. ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $n=3$ . ..... 39
- Figura 20. Composición proximal de *N. incerta* y cocultivo. ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha=0.05$ .  $a>b$ .  $n=3$  ..... 40
- Figura 21. Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila a (Chl-a), clorofila c (Chl-c) y carotenoides (car) de *N. incerta* en presencia o ausencia de *V. harveyi* al finalizar el reto de inhibición. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para cada grupo de pigmentos. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos:  $a>b$ .  $n=3$ . ..... 42
- Figura 22. Valores promedio y desviación estándar de la curva de crecimiento de *N. laevis*, mantenida en cultivos por lote en matraces Erlenmeyer con 100 mL en medio "f". ..... 43
- Figura 23. Valores promedio y desviación estándar de la curva de crecimiento de *N. laevis*, evaluada por densidad óptica a 680 nm, mantenida en cultivos por lote en matraces Erlenmeyer con 100 mL en medio "f". ..... 43
- Figura 24. Valores promedio y desviación estándar del pH medido durante el crecimiento de *N. laevis*, mantenida en cultivos por lote en matraces Erlenmeyer con 100 mL en medio "f". ..... 44
- Figura 25. Curvas de crecimiento de *N. laevis*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de *N. laevis* en presencia o ausencia de *V. alginolyticus*. *N. laevis* (○), *N. laevis* en

- cocultivo con *V. alginolyticus* (●). Se realizó una prueba t de Student para cada tiempo. A>b. Valores promedio  $\pm$  DE, n=3..... 45
- Figura 26. Reto de inhibición en cocultivo de *N. laevis* contra *V. alginolyticus*. *N. laevis* (●), *V. alginolyticus* (□), *V. alginolyticus* en medio "f" (■) y bacterias heterotróficas (▲). Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). n=3. .... 46
- Figura 27. Valores de peso seco total, peso seco orgánico y cenizas para *N. laevis*, cocultivo y *V. alginolyticus*. ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). n=3 ..... 47
- Figura 28. Composición proximal de *N. laevis* y cocultivo. ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha=0.05$ . n=3..... 48
- Figura 29. Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila a (Chl-a), clorofila c (Chl-c) y carotenoides (car) de *N. laevis* en presencia o ausencia de *V. alginolyticus* al finalizar el reto de inhibición. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para cada grupo de pigmentos. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b. n=3..... 50
- Figura 30. Curvas de crecimiento de *N. laevis*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de *N. laevis* en presencia o ausencia de *V. harveyi*. *N. laevis* (○), *N. laevis* en cocultivo con *V. harveyi* (●). Se realizó una prueba t de Student para cada tiempo y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) a>b. Valores promedio  $\pm$  DE, n=3..... 51
- Figura 31. Reto de inhibición en cocultivo de *N. laevis* contra *V. harveyi*. *N. laevis* (●), *V. harveyi* (□), *V. harveyi* en medio "f" (■) y bacterias heterotróficas (▲). Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). n=3. .... 52
- Figura 32. Valores de peso seco total, peso seco orgánico y cenizas para *N. laevis*, cocultivo y *V. harveyi*. ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). n=3. .... 53
- Figura 33. Composición proximal de *N. laevis* y cocultivo. ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). n=3..... 54
- Figura 34. Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila a (Chl-a), clorofila c (Chl-c) y carotenoides (car) de *N. laevis* en presencia o ausencia de *V. harveyi* al finalizar el reto de inhibición. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para cada grupo de pigmentos. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos: a>b. n=3. .... 56
- Figura 35. Reto de inhibición en cocultivo de *N. incerta* contra *V. alginolyticus*. *N. incerta* (●), *V. alginolyticus* (□), *V. alginolyticus* en medio "f" (■) y bacterias heterotróficas (▲). Filtrado de 1 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). n=3. .... 72
- Figura 36. Reto de inhibición en cocultivo de *N. incerta* contra *V. alginolyticus*. *N. incerta* (●), *V. alginolyticus* (□), *V. alginolyticus* en medio "f" (■) y bacterias heterotróficas (▲). Filtrado de 10 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). n=3. .... 72

- Figura 37. Reto de inhibición en cocultivo de *N. incerta* contra *V. harveyi*. *N. incerta* (●), *V. harveyi* (□), *V. harveyi* en medio "f" (■) y bacterias heterotróficas (▲). Filtrado de 1 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). n=3. .... 73
- Figura 38. Reto de inhibición en cocultivo de *N. incerta* contra *V. harveyi*. *N. incerta* (●), *V. harveyi* (□), *V. harveyi* en medio "f" (■) y bacterias heterotróficas (▲). Filtrado de 10 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). n=3. .... 73
- Figura 39. Reto de inhibición en cocultivo de *N. laevis* contra *V. alginolyticus*. *N. laevis* (●), *V. alginolyticus* (□), *V. alginolyticus* en medio "f" (■) y bacterias heterotróficas (▲). Filtrado de 1 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). n=3. .... 74
- Figura 40. Reto de inhibición en cocultivo de *N. laevis* contra *V. alginolyticus*. *N. laevis* (●), *V. alginolyticus* (□), *V. alginolyticus* en medio "f" (■) y bacterias heterotróficas (▲). Filtrado de 10 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). n=3. .... 74
- Figura 41. Reto de inhibición en cocultivo de *N. laevis* contra *V. harveyi*. *N. laevis* (●), *V. harveyi* (□), *V. harveyi* en medio "f" (■) y bacterias heterotróficas (▲). Filtrado de 1 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). n=3. .... 75
- Figura 42. Reto de inhibición en cocultivo de *N. laevis* contra *V. harveyi*. *N. laevis* (●), *V. harveyi* (□), *V. harveyi* en medio "f" (■) y bacterias heterotróficas (▲). Filtrado de 10 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). n=3. .... 75

## Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Vacunas autorizadas contra <i>Vibrio</i> spp. Modificada de Ji <i>et al.</i> (2020).....	8
Tabla 2. Condiciones de extracción para el análisis de proteínas de las diatomeas utilizadas.....	21
Tabla 3. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento y tiempo de generación de <i>N. incerta</i> en presencia y ausencia de <i>V. alginolyticus</i> . Prueba <i>t</i> de Student y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Valores promedio $\pm$ DE, n=3. ....	32
Tabla 4. Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de ácidos grasos de <i>N. incerta</i> en presencia o ausencia de <i>V. alginolyticus</i> y valores de <i>V. alginolyticus</i> en cultivo control (n=1)...	35
Tabla 5. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento y tiempo de generación de <i>N. incerta</i> en presencia y ausencia de <i>V. harveyi</i> . Prueba <i>t</i> de Student y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) a>b. Valores promedio $\pm$ DE, n=3.....	38
Tabla 6. Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de ácidos grasos de <i>N. incerta</i> en presencia o ausencia de <i>V. harveyi</i> y valores de <i>V. harveyi</i> en cultivo control (n=1). ....	41
Tabla 7. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento y tiempo de generación de <i>N. laevis</i> en presencia y ausencia de <i>V. alginolyticus</i> . Se realizó una prueba <i>t</i> de Student y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). a>b. Valores promedio $\pm$ DE, n=3. ....	45
Tabla 8. Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de ácidos grasos de <i>N. laevis</i> en presencia o ausencia de <i>V. alginolyticus</i> y valores de <i>V. alginolyticus</i> en cultivo control. ....	49
Tabla 9. Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento y tiempo de generación de <i>N. laevis</i> en presencia y ausencia de <i>V. harveyi</i> . ....	51
Tabla 10. Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de ácidos grasos de <i>N. laevis</i> en presencia o ausencia de <i>V. harveyi</i> y valores de <i>V. harveyi</i> en cultivo control.....	55

## Capítulo 1. Introducción

---

La acuicultura es la cría de organismos acuáticos en condiciones controladas o semicontroladas, es el sector de producción de alimento con mayor crecimiento a nivel mundial y provee casi el 50% de pescados y mariscos para el consumo humano. En 2020, la producción acuícola mundial alcanzó un récord de 122.6 millones de toneladas de animales acuáticos y 35.1 millones de toneladas de algas, y la tendencia es que siga en incremento (FAO, 2022; Stickney y Gatlin, 2022).

Debido al crecimiento acelerado de la población, la cual se calcula supere los 9,300 millones de habitantes para 2050, se buscan alternativas para la producción de alimento de calidad, siendo la acuicultura una opción ideal. Ésta actividad se presenta como una respuesta a las demandas nutricionales del futuro, proporcionando alimentos de calidad y ocasionando un menor impacto en el medio ambiente (Berger, 2020). Sin embargo, el crecimiento de la producción acuícola trae consigo el surgimiento de enfermedades, las cuales son producidas por parásitos, hongos, virus y bacterias, siendo estas últimas las que afectan principalmente a los cultivos acuícolas (Yanong *et al.*, 2012).

Una de las principales enfermedades producidas por bacterias es la vibriosis, la cual se define como una infección sistémica bacteriana causada por la familia *Vibrionaceae*. Se ha reportado que este tipo de bacterias han provocado mortalidades masivas en crustáceos, moluscos y peces, tanto en organismos cultivados como silvestres. En los peces, esta enfermedad se caracteriza por anorexia, letargia, ulceraciones en el cuerpo, oscurecimiento de la piel, presencia de fluidos abdominales, ojos opacos y pérdida del apetito. La vibriosis en peces provoca altas mortalidades y esto conlleva a grandes pérdidas económicas para los productores acuícolas (Ransangan y Mustafa, 2009; Ina-Salwany *et al.*, 2019; Mohamad *et al.*, 2019).

Existen diferentes métodos para controlar o eliminar a las bacterias patógenas, siendo para el caso de la vibriosis, el uso de antibióticos el principal tratamiento utilizado. Los antibióticos, son sustancias naturales o sintéticas producidas por los procesos metabólicos de microorganismos que pueden inhibir o matar a otros microorganismos. Los más utilizados a nivel global la tetraciclina, oxitetraciclina, enrofloxacina, amoxicilina, sarafloxacina, estreptomycin, el florfenicol y el ácido oxolínico (Defoirt *et al.*, 2011). En México los antibióticos más utilizados para contrarrestar las bacterias producidas por bacterias del género *Vibrio* son oxitetraciclina, florfenicol, ormetoprim-sulfametoxazol, sarafloxacina y enrofloxacina (Santiago *et al.*, 2009).

El uso profiláctico de los antibióticos por parte de los productores acuícolas, además de las altas dosis empleadas, han provocado la aparición de bacterias resistentes a antibióticos. La aparición de bacterias resistentes a los antibióticos repercute en la incapacidad de los organismos infectados de combatir las enfermedades. Por lo cual existe la necesidad de buscar nuevos tratamientos para erradicarlas. Además, la presencia de residuos de fármacos en los tejidos animales y el riesgo de transferir bacterias resistentes a los seres humanos, han provocado una gran preocupación por el uso de antibióticos en acuicultura, por lo cual es necesario la búsqueda de fuentes antimicrobianas naturales (Saracco-Álvarez, 2007; Preena *et al.*, 2020; Falaise *et al.*, 2016).

Dentro de la gran biodiversidad de organismos marinos, las microalgas representan una fuente prometedora de compuestos con actividad antibacteriana de origen natural (Falaise *et al.*, 2016). Las microalgas son un diverso grupo de microorganismos, predominantemente acuáticos, unicelulares, multicelulares o formadores de colonias. Las microalgas se encuentran en casi todos los hábitats del planeta, incluyendo océanos, ríos y lagos, teniendo como característica principal el ser los principales productores primarios, al llevar a cabo el proceso de fotosíntesis (Levine, 2018). Las microalgas producen metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de bacterias, hongos, virus y otros epibiontes. La actividad antibacteriana de las microalgas se atribuye mayoritariamente a la producción de ácidos grasos y a la síntesis de exopolisacáridos. Por lo anterior, las microalgas representan una alternativa al uso de antibióticos para controlar la vibriosis (Molina-Cárdenas y Sánchez-Saavedra, 2017).

## 1.1 Antecedentes

La acuicultura es el cultivo de organismos acuáticos en el mar, zonas costeras, así como aguas continentales, lo que implica intervenciones en el cultivo con la finalidad de aumentar la producción de alimentos. La acuicultura es el sector de producción de alimentos de más rápido crecimiento, provee más del 15% de proteína de origen animal y micronutrientes esenciales como calcio, hierro, vitamina A y zinc a la población mundial. Dentro de los principales grupos de organismos cultivados se encuentran crustáceos, moluscos, peces y en menor medida algas (FAO, 2022; Ina-Salwany *et al.*, 2019; Schar *et al.*, 2020).

En la producción acuícola de peces, se busca obtener los máximos rendimientos (altas tasas de crecimiento y supervivencia), mediante la aplicación y el control de condiciones tecnificadas que garanticen el buen desarrollo de los peces, desde su etapa larval hasta llegar a la talla comercial para su venta y consumo. Sin

embargo, estas condiciones controladas y tecnificadas han provocado el surgimiento de bacterias patógenas oportunistas, las cuales, en muchos casos provocan mortalidades masivas (Preena *et al.*, 2020).

Las bacterias son consideradas la principal causa de infecciones en la acuicultura intensiva de peces, crustáceos y moluscos en el mundo. Estas se presentan en todas las etapas larvales de peces y pueden provocar mortalidades masivas, implicando grandes pérdidas económicas para los productores. Se sabe que una amplia gama de especies de bacterias infecta especies cultivadas y silvestres, con consecuencias de leves a graves en la salud y la supervivencia de los organismos en cultivo. Entre las enfermedades bacterianas en los peces, se encuentran las causadas por los géneros *Aeromonas* sp. y *Pseudomonas* sp. que producen hemorragias en muchas especies de agua dulce. Además, entre las enfermedades causadas por bacterias, están las del género *Vibrio* sp., las cuales producen vibriosis en peces marinos y dulceacuícolas (Falaise *et al.*, 2016).

### ***Vibrio***

La familia *Vibrionaceae*, de la cual se han descrito 143 especies, cuenta con seis géneros: *Aliivibrio*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Photobacterium*, *Salinivibrio* y *Vibrio*; siendo el género *Vibrio* el principal agente causal de la vibriosis (Ina-Salwany *et al.*, 2019). Las bacterias del género *Vibrio* son gram-negativas, con forma de bacilo, la mayoría necesita cloruro de sodio (NaCl) para su crecimiento y se encuentran presentes en ambientes estuarinos, costeros y marinos en todo el mundo (Lechtumanan *et al.*, 2016). Las bacterias del género *Vibrio* desempeñan un papel fundamental en la degradación de la materia orgánica, regulando el carbono orgánico disuelto a niveles tróficos superiores en la cadena trófica marina (Ina-Salwany *et al.*, 2019).

Los vibrios son capaces de infectar una amplia variedad de huéspedes y también son las bacterias patógenas más comunes y dañinas del camarón, dentro de los que destacan *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*, ambos provocando mortalidades masivas en cultivos de camarón. También se ha reportado que el género *Vibrio* ha causado un gran número de mortalidades masivas en el cultivo de moluscos bivalvos (Falaise *et al.*, 2016).

La vibriosis es una de las enfermedades más prevalentes en el cultivo de peces. Esta puede ocurrir en organismos silvestres y cultivados, en agua salada, salobre o dulce, principalmente en aguas poco profundas. Además, la temperatura, la calidad de agua, la virulencia de la cepa de *Vibrio* y el estrés en los peces, son elementos importantes que influyen en la aparición de brotes de esta enfermedad. La vibriosis

se presenta en todas las etapas de vida, sin embargo, los peces juveniles son los más susceptibles a esta enfermedad (Crosa *et al.*, 2006; Ina-Salwany *et al.*, 2019).

Las principales especies del género que producen vibriosis son: *V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. anguillarum*. De este último se ha reportado casos de vibriosis en más de 50 especies de peces, tanto de agua dulce como salada, incluyendo especies de gran importancia comercial como el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Frans *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Lesiones hemorrágicas en la superficie ventral de la lubina europea (*Dicentrarchus labras*) infectada con el serotipo O1 de *V. anguillarum*. Tomada de Smith (2019).



**Figura 2.** Lesiones hemorrágicas en la cabeza y las bases de las aletas de una trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) infectada con *V. anguillarum* (abajo), comparada con trucha arcoíris sin infección (arriba). Tomada de Smith (2019)

La principal ruta de transmisión de la vibriosis en peces es por medio del agua a través del contacto directo de la bacteria con la piel, aletas, ano y agallas. Sin embargo, también se han reportado infecciones por la vía oral, al ingerir alimento contaminado (Yilmaz *et al.*, 2022). Debido a que se han observado casos de vibriosis asociados con lesiones de la piel o musculares, la penetración de las bacterias a través de lesiones o cortes en la epidermis es la forma más común de propagación. Cuando no hay lesiones en la piel o

musculares, la infección de *Vibrio* por medio de la piel se dificulta. Esto es debido a la presencia de mucus que actúa como una barrera para prevenir la entrada de organismos patógenos (Mohamad *et al.*, 2019).

### **Antibióticos**

El principal método para erradicar la vibriosis es el uso de antibióticos. Un antibiótico es una sustancia natural o sintética producida por los procesos metabólicos de microorganismos que pueden inhibir o matar a otros microorganismos. La capacidad de los antibióticos para afectar a los microorganismos difiere y se relaciona con el mecanismo de acción y la concentración (Stickney, 2000).

Los antibióticos de amplio espectro inhiben la síntesis de proteínas bacterianas; ejemplos de estos son las tetraciclinas. En el caso de los antibióticos de espectro reducido, actúan inhibiendo la formación de la pared celular bacteriana. Estos son más eficaces contra las bacterias Gram positivas (Stickney, 2000).

El uso rutinario de los antibióticos, incluso cuando no hay signos de enfermedad en el cultivo representa un grave problema, ya que propicia la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos. En la actualidad, los principales antibióticos utilizados para controlar las infecciones por vibriosis en la acuicultura son: tetraciclinas, doxiciclinas, cefalosporinas y fluoroquinolonas (Ji *et al.*, 2020).

La intensificación de la producción acuícola y el aumento de la incidencia de patógenos en organismos acuáticos, impulsan el uso de antimicrobianos y a su vez, la resistencia antimicrobiana en una gran diversidad de especies de cultivo. En comparación con el uso de antimicrobianos en la producción de organismos terrestres, la aplicación de antimicrobianos en la acuicultura proporciona una vía de exposición ambiental más amplia para la distribución de estos medicamentos a través del agua. Por lo tanto, el uso de los antibióticos en la acuicultura ocasiona importantes implicaciones para la salud del ecosistema, como la distribución de residuos de antibióticos en el ambiente, incrementando la resistencia antimicrobiana en bacterias acuáticas (Pepi y Focardi, 2021; Schar *et al.*, 2020).

Además, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) ha prohibido utilizar ciertos antibióticos en la actividad acuícola, para evitar las consecuencias negativas en los consumidores. Esta prohibición de la FDA es debida a que en ocasiones se pueden encontrar residuos de antibióticos en el músculo del pescado, lo cual ocasiona problemas de salud pública. Por lo anterior, es necesario buscar alternativas más seguras y amigables con el ambiente para controlar la vibriosis en peces en condiciones de cultivo (Ji *et al.*, 2020).

Debido al gran problema que representa la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos, se busca encontrar agentes de biocontrol naturales para contrarrestar a las bacterias patógenas en la acuicultura. Actualmente se buscan alternativas al uso de antibióticos para combatir la vibriosis y se propicia el uso de bacteriófagos, vacunas o microalgas (Falaise *et al.*, 2016; Ji *et al.*, 2020; Lechtumanan *et al.*, 2016).

### **Bacteriófagos**

Los bacteriófagos o fagos, son virus que tienen la capacidad de infectar células bacterianas, multiplicarse, resultando en la muerte de la célula hospedera y son los organismos más abundantes en el ambiente. Existen dos tipos de bacteriófagos, los líticos y los lisogénicos (Letchumanan *et al.*, 2016)

Los fagos líticos infectan a las bacterias huésped mediante la adhesión del fago a la bacteria y la inserción del genoma del fago en la célula huésped, causando, el cese en la síntesis de los componentes del hospedero, montaje de nuevas partículas del fago, lisis del huésped y liberación de fagos de progenie. Dado que este tipo de fagos se replican rápido, causan la muerte y lisis del huésped velozmente, son ideales para el desarrollo de terapias para reducir a bacterias patógenas (Richards, 2014).

En contraste los fagos lisogénicos, insertan su ADN en el cromosoma bacteriano, lo que permite que el ADN del fago (ahora llamado profago) sea copiado y transmitido junto con el propio ADN de la célula. Sin embargo, se quedan en un estado latente en la célula bacteriana (Letchumanan *et al.*, 2016).

Se han realizado diferentes estudios con bacteriófagos líticos con el objetivo de controlar bacterias patógenas y disminuir el uso de antibióticos. Le *et al.* (2020) utilizaron bacteriófagos para controlar la contaminación por *V. alginolyticus* de las larvas de ostión (*Saccotrea glomerata*), obteniendo una mortalidad de  $28.2 \pm 3.5\%$ , comparada con  $77.9 \pm 9.1\%$  del grupo control. Uno de los principales patógenos responsables de las altas mortalidades de larvas de ostión es *V. corallilyticus*. Richards *et al.* (2021) lograron una reducción de la mortalidad (91%) de larvas de ostión (*Crasostrea virginica*) y (*Crassostrea gigas*) después de 6 días de tratamiento con bacteriófagos infectados con *V. corallilyticus*. Higuera *et al.* (2013) aislaron 6 especies de bacteriófagos capaces de infectar a una cepa patógena de *V. anguillarum*, incrementando la supervivencia de salmones (*Salmo salar*), en un 100%, comparado con un 10% en el grupo control que al cual no se le aplicó la terapia de fagos.

## Vacunas

Las vacunas son un método alternativo al uso de antibióticos y para controlar las enfermedades bacterianas en peces. Las vacunas tienen el propósito de inducir y construir resistencia en el huésped contra un patógeno específico. Las vacunas inyectables tienen la ventaja de que se conoce la dosis del antígeno, facilitando la correlación de la dosis del antígeno con la protección de la vacuna (Abu Nor *et al.*, 2020).

Las vacunas tradicionales se componen de microorganismos patógenos y sus metabolitos por medio de atenuación, detoxificación o inactivación. Estas vacunas se dividen en vacunas inactivadas y vacunas atenuadas. Las vacunas inactivadas contienen a la bacteria o virus intactos muertos por métodos físicos o químicos después de su amplificación y cultivo, lo que les hace perder patogenicidad y retener antigenicidad. Las vacunas vivas atenuadas utilizan una forma debilitada o atenuada del microorganismo que causa la enfermedad y debido que estas vacunas son tan parecidas a la infección natural, crean una respuesta inmunitaria fuerte y de larga duración (Ji *et al.*, 2020).

La mayoría de las vacunas actuales contra vibriosis en peces son administradas por medio de inyección (Tabla 1). El uso de vacunas por inyección para peces en granjas de cultivo puede resultar imposible de llevar a cabo, debido a la cantidad de organismos que se manejan y por el manejo para su aplicación representa un factor estresante. Otra desventaja del uso de las vacunas es que los peces juveniles no pueden adquirir inmunidad a largo plazo, debido a que poseen un sistema inmunológico inmaduro, lo cual hace que la protección sea limitada o inexistente (Ji *et al.*, 2020).

**Tabla 1.** Vacunas autorizadas contra *Vibrio* spp. Modificada de Ji *et al.* (2020).

Nombre	Patógeno	Principal hospedero	Tipo de vacuna	Método de aplicación
Aquavac 6 vet	Virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) serotipo <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. salmonicoides, <i>Vibrio salmonicida</i> serotipo O1, <i>Vibrio anguillarum</i> serotipo O2a, <i>Mortiella viscosa</i>	Salmón del Atlántico	Inactivada	Inyección intraperitoneal
Aquavac PD7 vet	Virus de la enfermedad del páncreas del salmón (SPVD) cepa F93-125, virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) serotipo <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. salmonicoides, <i>Vibrio salmonicida</i> serotipo O1, <i>Vibrio anguillarum</i> serotipo O2a, <i>Mortiella viscosa</i>	Salmón del Atlántico	Inactivada	Inyección intraperitoneal
ALPHA JECT® micro 4	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>Salmonicida</i> , <i>Listonella (Vibrio) anguillarum</i> serotipos O1 y O2; <i>Vibrio salmonicida</i>	Salmón del Atlántico	Inactivada	Inyección intraperitoneal
Forte V II	Virus de la anemia infecciosa del salmón, <i>Aeromonas salmonicida</i> , <i>Vibrio anguillarum</i> serotipos I y II, <i>Vibrio ordalii</i> , <i>Vibrio salmonicida</i> serotipos I y II	Salmón	Inactivada	Inyección intraperitoneal
Vibrogen 2	<i>Vibrio anguillarum</i> serotipos I y II, <i>Vibrio ordalii</i>	Salmónidos	Inactivada	Inyección intraperitoneal / Inmersión
Forte Micro	<i>Aeromonas salmonicida</i> , <i>Vibrio anguillarum</i> serotipos I y II, <i>Vibrio ordalii</i> , <i>Vibrio salmonicida</i> serotipos I y II	Salmónidos	Inactivada	Inyección intraperitoneal
Vacuna de ingeniería genética del rodaballo <i>Vibrio anguillarum</i> , cepa viva (MVAV6203)	Cepa MVAV6203 Atenuada de <i>Vibrio anguillarum</i>	Rodaballo	Atenuada	Inyección intraperitoneal

## Microalgas

Las microalgas se encuentran presentes en casi todos los ecosistemas del mundo. Estos organismos evolucionaron en ambientes extremadamente competitivos y se encuentran expuestas a patógenos microbianos tales como bacterias, virus y hongos. Para sobrevivir, las microalgas desarrollaron estrategias de tolerancia o defensa. La variedad de formas, tamaños y estrategias de vida de las microalgas dio lugar a una alta diversidad de compuestos sintetizados a partir de diversas vías metabólicas. Muchos compuestos valiosos se pueden extraer de las microalgas, incluyendo pigmentos, lípidos, proteínas, polisacáridos, vitaminas o minerales. Varios de estos compuestos obtenidos de las microalgas, han mostrado potentes actividades biológicas, como antioxidantes, anticoagulantes, antiinflamatorios, antimicrobianos o antitumorales (Falaise *et al.*, 2016).

El primer trabajo que demostró la actividad de las microalgas contra bacterias lo realizó Pratt en 1944, utilizando la microalga verde *Chlorella* contra varias especies de bacterias Gram-positiva (G+) y Gram-negativa (G-).

Se ha reportado actividad antibacteriana de microalgas tanto in vitro como in vivo. Dentro de los ensayos in vitro, se reportó la actividad antimicrobiana de la microalga *Chaetoceros lauderi* contra *V. anguillarum* y *Aeromonas salmonicida* (Viso *et al.*, 1987).

La técnica del “agua verde” ha demostrado efectos benéficos sobre la salud, las tasas de supervivencia y la resistencia de diferentes organismos en cultivo. La adición de la microalga *Isochrysis galbana* permitió una mejor viabilidad y un crecimiento más rápido de las larvas del rodaballo (*Scophthalmus maximus*), así como una menor proliferación de bacterias oportunistas (Salvesen *et al.*, 1999; Falaise *et al.*, 2016). Para el caso de *Chlorella* sp. se encontró actividad antimicrobiana contra *V. harveyi* a una concentración de  $1 \times 10^3$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL, observando una inhibición total al segundo día del reto (Tendencia y de la Peña, 2003). Además, se han reportado que extractos metanólicos, etanólicos, con acetona y mezcla de acetona-etanol de biomasa de *Euglena viridis* tienen una actividad antibacteriana contra *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. fluvialis*, *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* (Das *et al.*, 2005).

Para el caso de experimentos en cocultivo, Lio-Po *et al.* (2005), utilizaron un cultivo axénico de *Chaetoceros calcitrans* y otro de *Nitzschia* sp., logrando inhibir a *V. harveyi* a las 24 y 48 h post inoculación, respectivamente, durante un reto de inhibición de 7 días por medio de un cultivo de agua verde.

González-Davis *et al.* (2012), reportaron la inhibición de *V. campbellii* por medio de un extracto acuoso de *Dunaliella tertiolecta*, la cual también resultó no ser tóxica para nauplios de *Artemia franciscana*, organismo utilizado como alimento vivo en los primeros estadios larvales de peces y crustáceos.

Gastineau *et al.* (2012), al utilizar pigmentos purificados de *Haslea karadagensis*, reportaron actividad antimicrobiana contra las bacterias *Polaribacgter irgensii*, *Pseudoalteromonas elyakowii* y *V. aestuarianus*.

Kokou *et al.* (2012), realizaron un estudio con el método de cocultivos y reportaron la inhibición de *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. lentus*, *V. parahaemolyticus*, *V. scophthalmi* y *V. splendidus* al ser cocultivados con *Chlorella minutissima*.

Dentro del grupo de las microalgas, las diatomeas son organismos fotosintéticos responsables del 20% de la fotosíntesis del planeta. Estos organismos tienen la pared celular de sílice, lo cual provoca que se hundan al morir, transportando el carbono orgánico a las profundidades del océano. Por lo tanto, este grupo desempeña un papel fundamental en la conformación del ciclo del carbono (Amin *et al.*, 2012). Este grupo de organismos ha demostrado tener un gran potencial como agente de biocontrol de patógenos.

Molina-Cárdenas (2011), evaluó la capacidad inhibitoria de las diatomeas *Navicula incerta*, *Nitzschia laevis*, *N. byskantera* y *N. frustulum* var. *perminuta* contra las bacterias patógenas *V. alginolyticus*, *V. campbellii* y *V. harveyi*, por medio del método de cocultivo, reportando una alta actividad antibacteriana con estas especies de diatomeas.

Ayala-García (2021), evaluó el efecto inhibitorio de las diatomeas *N. thermalis* f. *kurta* y *N. cf. subinflatooides* contra las bacterias *V. alginolyticus*, *V. campbellii* y *V. harveyi*, reportadas como patógenas en cultivos acuícolas. Se detectó la inhibición de *V. alginolyticus* a las 48 h, *V. harveyi* a las 96 h y *V. campbellii* a las 96 h por efecto de *N. thermalis*. Para *N. subinflatooides*, la inhibición de *V. alginolyticus* y *V. harveyi* se reportó a las 48 h, mientras que la de *V. campbellii* fue a las 96 h.

## 1.2 Justificación

El desarrollo de la actividad acuícola se ha visto mermado por la aparición de bacterias patógenas dentro de las que destaca el género *Vibrio*, el cual puede provocar mortalidades masivas. El principal remedio para erradicar a estas bacterias, son los antibióticos, lo que ha provocado el incremento de bacterias resistentes debido al uso profiláctico de estos compuestos. Además, el uso indiscriminado de los antibióticos puede representar una seria amenaza para la salud pública y al ambiente. Por lo anterior, el uso de alternativas naturales como las microalgas para erradicar a la vibriosis en peces representa un medio de biocontrol más económico y amigable con el ambiente.

## 1.3 Hipótesis

Al mantener las cepas de *Vibrio alginolyticus* y *V. harveyi* en cocultivo con las especies de diatomeas (*Navicula incerta* y *Nitzschia laevis*), se disminuirá el número de bacterias patógenas del género *Vibrio*.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad inhibitoria de las diatomeas *N. incerta* y *N. laevis* para su potencial uso contra dos especies del género *Vibrio* patógenos en acuicultura.

### 1.4.2 Objetivos específicos

Evaluar la capacidad inhibitoria de las especies de microalgas (*N. incerta* y *N. laevis*) contra bacterias patógenas (*V. alginolyticus* y *V. harveyi*) en cocultivo y por monitoreo de la densidad de células de cada especie de microalga en cocultivo, bacterias heterotróficas en cocultivo y bacterias patógenas del género *Vibrio*.

Valorar la composición proximal, contenido de lípidos y composición de ácidos grasos de cada una de las especies de microalgas (*N. incerta* y *N. laevis*) al ser mantenidas en cocultivo para cada especie de bacteria patógena (*V. alginolyticus* y *V. harveyi*).

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Estandarización de metodología y selección de organismos

#### 2.1.1 Obtención de las cepas de microalgas

La diatomea *Navicula incerta* fue aislada de la Bahía de Todos Santos, B.C. por personal del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC). La diatomea *Nitzschia laevis* fue aislada del Ejido Eréndira en Baja California por Correa-Reyes (2001).

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

#### 2.1.2 Mantenimiento de las cepas y cultivos de microalgas

Las cepas de las dos especies de diatomeas se mantuvieron de forma no axénica y monoespecífica en lotes y sin recambio de medio. Los medios de cultivo se prepararon utilizando agua de mar proveniente del sistema semicerrado que abastece al Laboratorio Húmedo Central del Departamento de Acuicultura (CICESE). El agua de mar tuvo un proceso de sedimentación y pasó por una serie de filtros de arena y cartuchos de fibra de vidrio de 10, 5 y 1  $\mu\text{m}$  y fue irradiada con luz ultravioleta.

Para la preparación del medio de cultivo, el agua de mar fue esterilizada en autoclave a 121 °C y a una presión de 1.02 kg/cm<sup>2</sup> durante 21 min.

Las especies de diatomeas se cultivaron de forma monoespecífica y en sistemas por lotes en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 100 mL de agua de mar estéril con medio "f" (Guillard y Ryther, 1962). Para cada uno de los cultivos se realizó un mantenimiento semanal al inocular un nuevo cultivo con un volumen del 10% (10 mL) del cultivo madre. Las condiciones ambientales de mantenimiento de los cultivos fueron temperatura de 22 °C, irradiancia continua de luz blanca fría (SILVANA F40W) a 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , sin aireación y con agitación manual diaria.

### 2.1.3 Evaluación del crecimiento de las microalgas

El crecimiento de las diatomeas *N. incerta* y *N. laevis* se realizó de forma monoespecífica, por triplicado y en matraces Erlenmeyer de 1 L con 500 mL de medio “f” preparado con agua de mar. Los cultivos se mantuvieron en condiciones ambientales similares como las indicadas en el inciso 2.1.2.

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

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

$\mu$  = Tasa de crecimiento específica (divisiones por día)

$N_2$  = Concentración de células tiempo 2

$N_1$  = Concentración de células tiempo 1

$\log_2$  = Logaritmo de base 2 de la concentración de células

$t_2$  = Tiempo 2

$t_1$  = Tiempo 1

El tiempo de generación (TG) se calculó con la siguiente ecuación:

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

TG = Tiempo de generación

$\mu$  = tasa de crecimiento

### 2.1.4 Cultivo de *Vibrio*

Las tres especies de *Vibrio* que se utilizaron inicialmente se obtuvieron de la Colección de Microorganismos del CICESE, la cual se encuentra bajo el resguardo del Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida, investigador del Departamento de Biotecnología Marina del CICESE. Las tres cepas de *Vibrio* fueron seleccionadas por ser patógenas para organismos acuáticos en cultivo. Dos de las cepas provienen de la “American Type Culture Collection” y éstas son *Vibrio alginolyticus* (ATCC 17749/CICESE 04) y *Vibrio anguillarum* (ATCC 19264/CICESE 06). Mientras que la cepa de *Vibrio harveyi* (DN 01/CICESE 597), fue donada por la Dra.

Martha Gómez-Chiarri de la Universidad de Rhode Island, EUA, señalada como patógena para el lenguado (*Paralichthys dentatus*) del Atlántico.

Los cultivos de las especies de *Vibrio* se realizaron de forma monoespecífica en tubos de vidrio de 10 mL con medio ZoBell (Oppenheimer y Zobell, 1952). El medio de cultivo ZoBell se esterilizó en una autoclave a 121 °C y a una presión de 1.02 kg/cm<sup>2</sup> durante 21 minutos, para posteriormente vaciarlo en cajas Petri de plástico con medidas de 100 x 10 mm. Para cada especie de *Vibrio* se tomó una azada del tubo, la cual se sembró en cajas Petri con 20 mL de medio ZoBell esterilizado. Las cajas con los cultivos de las distintas especies de *Vibrio* spp. se incubaron a 28 °C por 24 horas.

### 2.1.5 Preparación del inóculo bacteriano

Para la cosecha y diluciones de las especies de *Vibrio*, se prepararon tubos de ensayo con 9 mL de suero fisiológico (8.9 g NaCl/L, equivalente a 0.89%). Previo a su uso, los tubos con suero fisiológico se esterilizaron en una autoclave a 121 °C y a una presión de 1.02 kg/cm<sup>2</sup> durante 21 minutos. Una vez esterilizados los tubos con suero, se refrigeraron a 4 °C hasta su uso.

Los cultivos de cada una de las especies de *Vibrio* se sembraron de manera monoespecífica en cajas Petri con medio ZoBell. A cada uno de los cultivos se le agregó 2 mL de suero fisiológico para su cosecha.

Para ello, después de agregar el suero, se removió la capa de bacterias evitando raspar la superficie del medio de cultivo. Las bacterias que lograron ser recuperadas de las cajas Petri, se colocaron en un tubo de cultivo con suero fisiológico estéril. Los tubos con el inóculo de cada una de las especies de *Vibrio* se agitaron de forma manual y se dejaron reposar hasta que los agregados de bacteria se encontraban completamente disueltos. Una vez que ya no se observaron agregados bacterianos de *Vibrio*, se adicionó poco a poco de esta mezcla a un nuevo tubo de cultivo con suero fisiológico y se realizaron mediciones en un espectrofotómetro a 600 nm hasta obtener una densidad óptica de 0.05 y que corresponde a una densidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mL de  $1 \times 10^6$  UFC/mL estimada por Anguiano-Beltrán (1996).

Debido al bajo crecimiento de las cepas *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CICESE 04) y *V. anguillarum* (ATCC 19264/CICESE 06) se utilizó una mayor concentración de suero fisiológico (25 g NaCl/L equivalente a 2.5%) y se siguió el mismo procedimiento para la preparación del inóculo bacteriano descrito en esta sección.

### 2.1.5.1 Controles experimentales para evaluar la presencia o ausencia de *Vibrio* spp.

Para garantizar que los retos de inhibición se realizaran de manera correcta, se aplicaron varios controles en los ensayos.

El primer control experimental, consistió en sembrar en cajas Petri que contenían medio Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS, Difco) (Tamura *et al.*, 1971) con la cepa de *Vibrio* a utilizar en el reto de inhibición. Este sembrado tenía como objetivo corroborar que la cepa a utilizar pertenecía al género *Vibrio*, ya que el medio TCBS es un medio selectivo para este género. El resultado esperado fue detectar crecimiento de *Vibrio* en este medio.

El segundo control experimental, fue corroborar la no presencia de *Vibrio* en las unidades experimentales con diatomeas en medio "f" y previo a inocular con el *Vibrio* a utilizar en el experimento. Se realizaron filtrados de 1 y 10 mL de las muestras de las unidades experimentales y se utilizaron filtros estériles de nitrocelulosa de 47 mm de diámetro, con cuadrícula de referencia y una luz de malla de 0.22  $\mu\text{m}$ . Los filtros con muestra se incubaron en cajas Petri con medio TCBS a 28 °C por 24 horas. Después del tiempo de incubación, se realizó el conteo de las colonias. El resultado esperado fue no detectar crecimiento de *Vibrio* antes de inocular con la especie de *Vibrio* bajo estudio.

El tercer control experimental, fue corroborar que la concentración inicial a la cual se inocularon las unidades experimentales que contenían *Vibrio* (control y cocultivo), correspondieran a la densidad de  $1 \times 10^4$  UFC/mL. Para esto se siguió el método, descrito por Anguiano-Beltrán (1996), y se ajustó la densidad óptica de 0.05 a 600 nm. Por lo anterior, al inocular los matraces Erlenmyer con 800 mL de medio "f" en agua de mar con 8 mL de inóculo ajustado, debería haber una densidad de  $1 \times 10^4$  UFC/mL. Para corroborar que esta densidad de *Vibrio* estuviera en los valores correctos, se realizaron sembrados en cajas Petri con medio TCBS inmediatamente después de la inoculación a las diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  para facilitar los conteos. Este control nos permitió corroborar que la concentración inicial fue superior, inferior o en efecto igual a  $1 \times 10^4$  UFC/mL.

Como cuarto control experimental, se evaluó la no toxicidad del medio "f" sobre el *Vibrio* en estudio, para esto se realizaron filtrados de 1 y 10 mL de las muestras de las unidades experimentales y se utilizaron filtros estériles de nitrocelulosa de 47 mm de diámetro, con cuadrícula de referencia y una luz de malla de 0.22  $\mu\text{m}$ . Además, se realizaron sembrados con diluciones de  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  en cajas Petri con medio TCBS. El

resultado esperado fue que la concentración de *Vibrio* se mantuviera en  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$ , de lo contrario se podría interpretar que el medio “f” resultó tóxico para el crecimiento del *Vibrio* bajo estudio.

### 2.1.6 Conteo de bacterias heterotróficas

Las bacterias heterotróficas asociadas a los cultivos no-axénicos de microalgas se evaluaron previamente a inocular los cultivos de cada especie de diatomea con *Vibrio* spp. y durante los distintos tiempos de evaluación del experimento (0+1, 24, 48, 96, 120, 144, 168 y 192 h). Se cuantificó el número de bacterias heterotróficas mediante conteo indirecto en cajas Petri con medio ZoBell. La evaluación de la concentración de bacterias heterótrofas fue de utilidad para comprobar que el efecto inhibitorio de los cultivos de las diatomeas *N. incerta* y *N. laevis*, es específico sobre los vibrios bajo estudio y no afectó al resto de bacterias heterotróficas.

### 2.1.7 Estandarización del crecimiento de *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CICESE 04)

Tomando en cuenta el nulo crecimiento de *V. alginolyticus*, se decidió realizar un experimento para estandarizar su crecimiento. Se inocularon matraces (por duplicado) en las siguientes concentraciones:  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^6$ , siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.1.5.

Se evaluó el crecimiento en suero fisiológico con concentración de 8.9 g NaCl/L y 25 g NaCl/L. Se midió el crecimiento en medio TCBS preparado de forma normal, añadiendo 3% y 6% más de NaCl. Se realizaron sembrados en TCBS a distintas diluciones ( $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  para la concentración de  $1 \times 10^4$  y  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  a la concentración  $1 \times 10^6$ ), así como filtrados en medio TCBS en 1 y 10 mL. En este ensayo además se realizaron sembrados en medio ZoBell como se describe en la sección 2.1.6.

#### 2.1.7.1 Tinción de Gram *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CICESE 04)

Debido a los problemas obtenidos con el crecimiento de la cepa *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CICESE 04), se determinó realizar una tinción de Gram para evaluar una posible contaminación de la cepa. Se preparó el inóculo bacteriano, se tiñó con cristal violeta por 2 min y se lavó con abundante agua para eliminar el exceso de colorante. Posteriormente la muestra se cubrió con Lugol durante 1 min, se lavó con agua

destilada el exceso de Lugol. Se decoloró la muestra con alcohol-acetona hasta que la preparación dejó de perder color (30 segundos) y se lavó con abundante agua para eliminar el resto del disolvente. La muestra se tiñó con fucsina básica durante 5 min y posteriormente se lavó con agua destilada para eliminar el contraste del colorante. La muestra se secó y se examinó al microscopio con los aumentos de 100X y 400X.

### **2.1.8 Obtención de cepas del “Collection of Aquatic Important Microorganisms” (CAIM) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Mazatlán**

Debido a problemas con el crecimiento de las cepas *V. anguillarum* (ATCC 19264/CICESE 06) y *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CICESE 04) se procedió a obtener las cepas *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CAIM 516), *V. corallilyticus* (CAIM 1765), *Photobacterium damsela piscicida* (ATCC 17749/CAIM 1910) y *V. (Listonella) anguillarum* (CAIM 8) de la “Collection of Aquatic Important Microorganisms” del Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Mazatlán.

#### **2.1.8.1 Estandarización del suero fisiológico para el crecimiento de *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CAIM 516) y *V. anguillarum* (CAIM 8)**

Para determinar la concentración de sal requerida por las cepas obtenidas de la colección del CAIM, *V. alginolyticus* y *V. anguillarum*, se realizó un experimento para cada especie, utilizando el suero fisiológico normal, preparado con 8.9 g de NaCl por cada litro de agua destilada y preparado con 25 g de NaCl por litro de agua destilada. Se realizaron sembrados para evaluar el crecimiento en cajas Petri con medio TCBS a las 0+1, 48, 96 y 120 h, las diluciones utilizadas fueron  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  como ya descrito en la sección 2.6.1. El crecimiento de *Vibrio* spp. fue evaluado por medio de conteos a las 24 horas después de cada sembrado, para determinar las diluciones a utilizar en el ensayo de inhibición.

## 2.2 Experimentación final

### 2.2.1 Retos de inhibición del crecimiento de *Vibrio*

El cultivo de cada especie de diatomea (*N. incerta* y *N. laevis*) se utilizó como inóculo para las unidades experimentales (control de diatomea y cocultivo con *Vibrio* spp.) y se verificó la ausencia de las bacterias del género *Vibrio* siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.1.5.1.

Se mantuvieron cultivos monoespecíficos, no axénicos y por triplicado en matraces Erlenmeyer de 1.0 L que contenían 800 mL de medio "f". La concentración inicial de células de cada especie de diatomea fue de 100,000 células/mL.

En cada uno de los cultivos se cuantificó el número de bacterias heterotróficas como se describe en la sección 2.1.6.

Para el reto de inhibición del crecimiento de *Vibrio* spp. los cultivos de diatomeas se inocularon a partir de la suspensión de *Vibrio* spp. con una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL, y un volumen adecuado previamente calculado para obtener una concentración inicial de  $1 \times 10^4$  UFC/mL para cada una de las dos especies de *Vibrio* (*V. alginolyticus* y *V. harveyi*). El inóculo de cada especie de *Vibrio* fue preparado como se describió en la sección 2.1.5. Como tratamiento control, se tuvieron cultivos por triplicado y sin inóculo de las especies de *Vibrio* bajo estudio, cuantificando bacterias en los medios TCBS para los vibrios y ZoBell para las bacterias heterótrofas totales.

Para monitorear el efecto inhibitorio de las diatomeas sobre los vibrios en los cocultivos, así como en los tratamientos control, cada día fueron evaluadas las densidades celulares de cada especie de diatomea como se describió en la sección 2.1.3. Se cuantificaron las densidades celulares de las bacterias heterotróficas (sección 2.1.6) y además la densidad de *Vibrio* spp. bajo experimentación (ver sección 2.5.1.5).

Las unidades experimentales usadas en los retos de inhibición y los tratamientos control se mantuvieron a 22 °C, con una irradiancia continua de  $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ .

En el día final del experimento se colectó y se filtró un volumen apropiado para realizar el análisis del peso seco, contenido de proteínas, pigmentos y lípidos. Además, para evaluar el efecto de la presencia de *Vibrio* en la composición de ácidos grasos de las diatomeas, se colectó una alícuota de 100 mL, se cosechó por centrifugación, se congeló y se liofilizó. Una vez liofilizada la biomasa, se conservó en atmósfera de nitrógeno y se mantuvo en congelación a -20 °C hasta el momento de realizar los análisis de ácidos grasos.

### 2.2.2 Evaluación del peso seco de *N. incerta* y *N. laevis*

Se realizó la evaluación del peso seco de las microalgas al finalizar el experimento, la medición fue por estimación gravimétrica y siguiendo la metodología descrita por Sorokin (1973). Para la obtención del peso seco total de las muestras, se tomaron 15 mL y se pasaron por filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C de 47 mm de diámetro y 1.0 µm de abertura de poro previamente pesados. Las muestras se enjuagaron con 10 mL de formiato de amonio al 3% para eliminar las sales presentes en el medio. Posteriormente, los filtros con muestra se introdujeron en una estufa a 60 °C, hasta que alcanzaron un peso constante.

Para evaluar las cenizas, los filtros con las muestras se colocaron en una mufla (Barnstead Thermolyn 1400) a 490 °C por 4 h y al obtener temperatura ambiente se trasladaron a una estufa. Una vez concluido el proceso de incineración, los filtros se colocaron en un desecador con silica gel por 15 min con la finalidad de alcanzar la temperatura ambiente para posteriormente pesarse en una balanza analítica (Mettler Toledo).

El peso seco total (PST) se obtuvo por la diferencia del peso seco del filtro con la muestra menos el peso del filtro sin muestra (Ecuación 3). El peso de las cenizas se obtuvo con el peso después de incinerar la muestra menos el peso del filtro solo (Ecuación 4). El peso seco orgánico (PSO) se obtuvo por la diferencia del peso seco total menos el peso de las cenizas (Ecuación 5).

$$\text{Peso seco total} = \text{Peso de la muestra seca en el filtro} - \text{Peso del filtro sin muestra} \quad (3)$$

$$\text{Peso de cenizas} = \text{Peso después de incinerar la muestra} - \text{Peso del filtro} \quad (4)$$

$$\text{Peso seco orgánico} = \text{Peso seco total} - \text{Peso de cenizas} \quad (5)$$

### 2.2.3 Composición proximal de *N. incerta* y *N. laevis*

#### 2.2.3.1 Contenido de lípidos

La extracción de lípidos se realizó por el método de Folch *et al.* (1957), y los lípidos totales se cuantificaron por el método gravimétrico.

#### 2.2.3.2 Contenido de carbohidratos

Los carbohidratos se obtuvieron restando el porcentaje de proteínas y lípidos totales al cien por ciento.

#### 2.2.3.3 Contenido de proteínas

La extracción de proteínas se llevó a cabo siguiendo el método de Malara y Charra (1972). Para cada especie de diatomea se utilizó una determinada concentración de hidróxido, temperatura y tiempo de extracción (Tabla 2). Para la cuantificación se leyeron las muestras en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm de acuerdo con el método descrito por Lowry (1951). Se realizó una curva de calibración y como estándar, se utilizó albumina de bovino al 98%.

**Tabla 2.** Condiciones de extracción para el análisis de proteínas de las diatomeas utilizadas.

Especie	Concentración de NaOH	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
<i>N. incerta</i>	0.1 N	30	100
<i>N. laevis</i>	0.2 N	20	100

### 2.2.4 Composición de ácidos grasos

El análisis de los ácidos grasos de los cultivos de las unidades experimentales mantenidas en los retos de inhibición se realizó de la siguiente manera: al final de los retos de inhibición, para cada tratamiento se tomó una alícuota de 100 mL, las cuales se centrifugaron a 4500 rpm durante 5 min a 4 °C con una centrifuga Eppendorf 5810R. El paquete celular de las muestras se congeló a -80 °C y liofilizado con un

equipo Labconco, Freezone 2.5 a  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $0.11\text{ kg cm}^{-2}$  de presión. Para llevar a cabo la extracción de los ácidos grasos, se utilizaron 50 mg de muestra liofilizada de cada condición experimental. Para *Vibrio harveyi* se utilizaron 29.72 mg de muestra. Los lípidos totales se extrajeron siguiendo la metodología descrita por Folch *et al.* (1957) y se utilizó una solución extractora de diclorometano-metanol (2:1) más butilhidroxitolueno (BHT) al 0.01% como antioxidante. La metilación fue realizada con un reactivo de esterificación (trifloruro de boro en metanol al 14%) de acuerdo con el método de Metcalfe *et al.* (1966). El estándar utilizado fue Supelco 37 Component FAME Mix de Sigma-Aldrich.

Para la identificación de los ácidos grasos, se utilizó un cromatógrafo de gases (GC Agilent Technologies 7890A), equipado con una columna capilar (Agilent J&W, 123-3232 DB-FFAP) (30 m de longitud, 0.32 mm de diámetro, 0.25  $\mu\text{m}$  de grosor de la película), y con un detector de ionización de flama ( $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e hidrógeno como gas de acarreo para la identificación de los ácidos grasos. La identificación se llevó a cabo mediante la comparación de los tiempos de retención relativos del estándar.

### **2.2.5 Extracción y cuantificación de pigmentos**

La extracción de pigmentos se realizó siguiendo el método de Parsons *et al.* (1984), la cuantificación se llevó a cabo mediante espectrofotometría y utilizando las ecuaciones descritas por Jeffrey y Humphrey (1975). Se filtraron 5 mL de cultivo de cada uno de los tratamientos al finalizar el experimento. Para realizar la extracción, los filtros fueron colocados en tubos de vidrio previamente forrados con papel aluminio, se añadieron 5 mL de acetona al 90% y los tubos fueron mezclados utilizando un vortex. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en refrigeración ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 24 h.

La cuantificación se llevó a cabo por medio de lecturas utilizando un espectrofotómetro (HACH DR-6000) colocando las muestras en una celda de cuarzo. Las lecturas se realizaron con un barrido de 400 a 700 nm de longitud de onda ( $\lambda$ ) y se utilizó como blanco la medición de acetona al 90%.

### **2.2.6 Tratamiento estadístico de los resultados**

Previo a realizar los análisis estadísticos de los datos, se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Si los supuestos se cumplían, se procedía a realizar una prueba de análisis de

varianza de una vía por medio una prueba paramétrica (ANOVA de 1 vía). En caso de que no se cumplieran los supuestos, se utilizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para comparar las diferencias en la densidad celular de bacterias heterotróficas, densidad celular de *Vibrio* spp., densidad celular de diatomeas, peso seco total, peso seco orgánico, contenido de cenizas y composición de ácidos grasos.

Se utilizó la prueba *a posteriori* de Tukey para determinar las diferencias específicas entre los tratamientos.

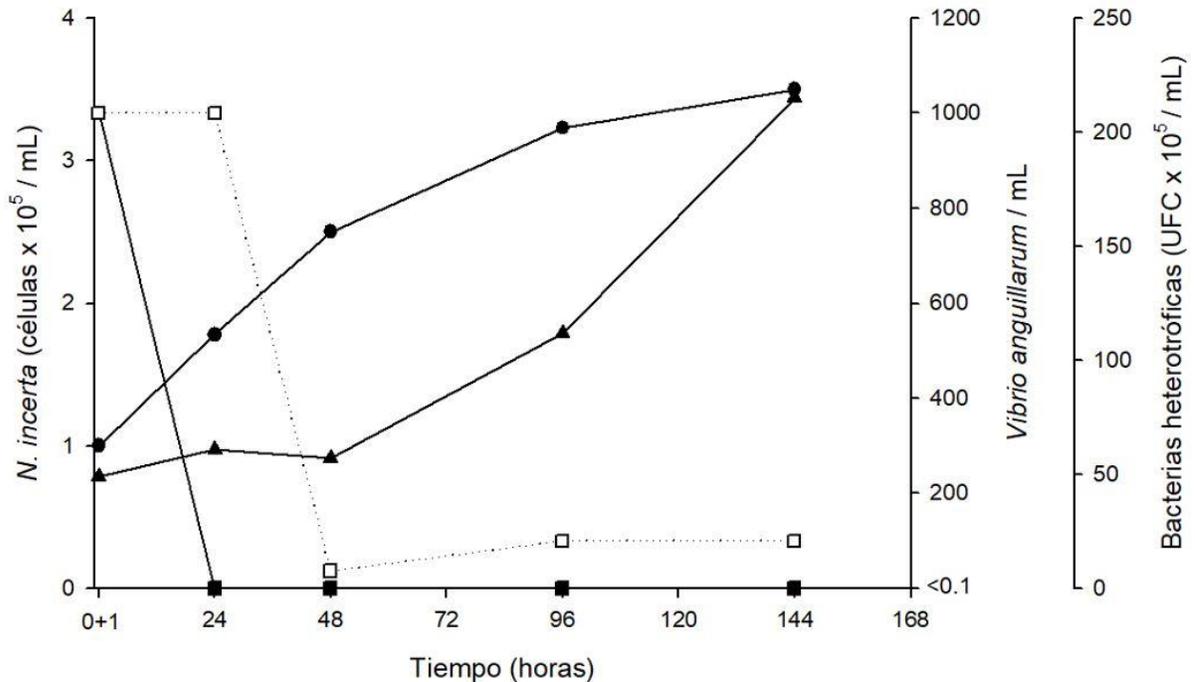
Para comparar los valores obtenidos de la densidad de células de la especie de diatomea en cultivo monoespecífico o en cocultivo con *Vibrio* spp., se realizaron pruebas *t* de Student entre tratamientos para los distintos tiempos de evaluación.

El nivel de confianza utilizado en las pruebas estadísticas fue del 95%. Los datos se procesaron en el programa estadístico STATISTICA® versión 7.0.

## Capítulo 3. Resultados

### 3.1 Estandarización de metodología y selección de organismos

#### 3.1.1 Reto de inhibición del crecimiento de *V. anguillarum* (ATCC 19264/CICESE 06)



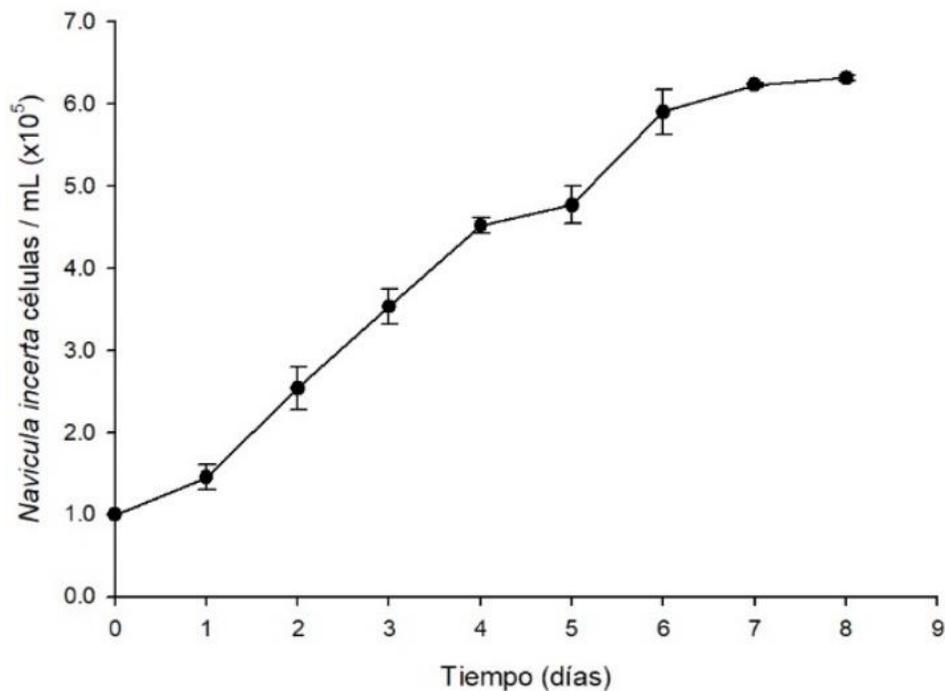
**Figura 3.** Reto de inhibición en cocultivo de *N. incerta* contra *V. anguillarum*. *N. incerta* (●), *V. anguillarum* (■), *V. anguillarum* en medio "f" (□) y bacterias heterotróficas (▲).

La densidad máxima celular alcanzada por *N. incerta* en cocultivo con *V. anguillarum* fue de  $3.5 \times 10^5$  células/mL. El valor máximo de bacterias heterotróficas en cocultivo fue de  $21.5 \times 10^6$  UFC/mL. La inhibición del crecimiento de *V. anguillarum* se presentó a las 24 h después de inocular los cultivos (Figura 3). Al inicio del ensayo de inhibición los cultivos presentaron concentraciones de 1000 *V. anguillarum*/mL, pasadas 24 h la concentración de *V. anguillarum* fue de 1.7 *V. anguillarum*/mL y a las 96 h los niveles de *V. anguillarum* fueron  $<0.1$  *V. anguillarum*/mL. Estos valores se mantuvieron hasta las 144 h. Sin embargo, el tratamiento control de *V. anguillarum* cultivado en medio "f" no logró mantener su densidad desde el inicio del experimento y hasta el final del reto de inhibición, a las 48 horas se detectaron 36.4 *V. anguillarum*/mL, mientras que a las 96 y 144 horas se detectaron concentraciones de 100 *V. anguillarum*/mL. Por lo cual no

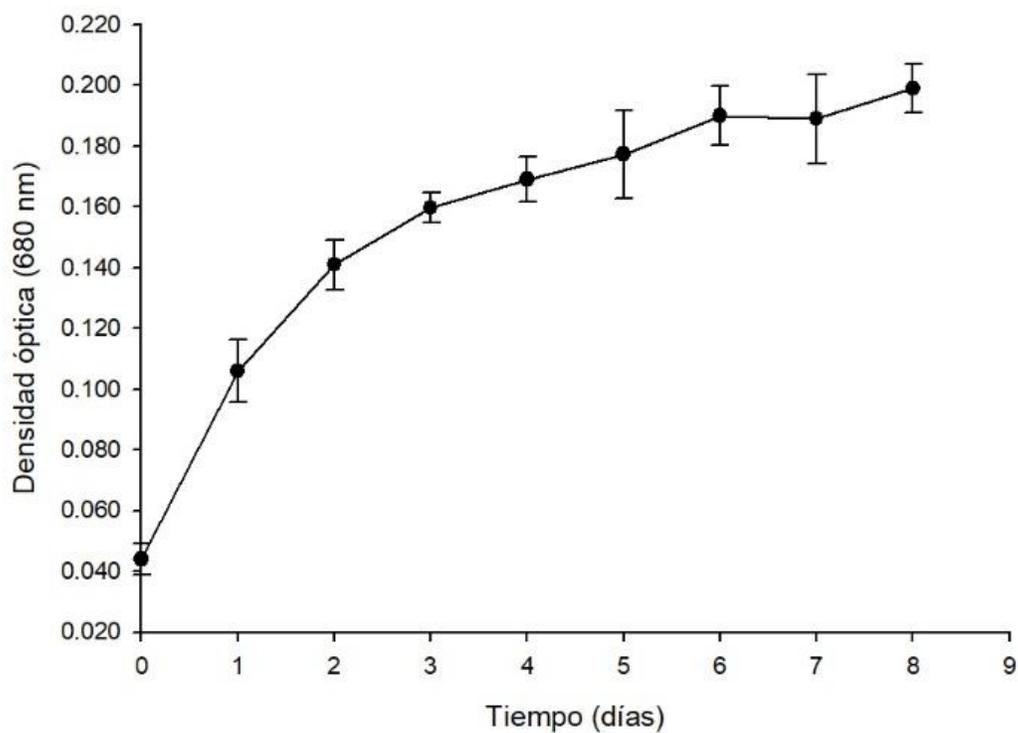
se puede afirmar un efecto inhibitorio, debido a que el control de *Vibrio* en medio "f" no se mantuvo sin cambio en la densidad, indicando una posible toxicidad del medio "f" o bien, que el medio TCBS no es el adecuado para el crecimiento de esta especie.

### 3.1.2 Caracterización de la curva de crecimiento de *N. incerta*

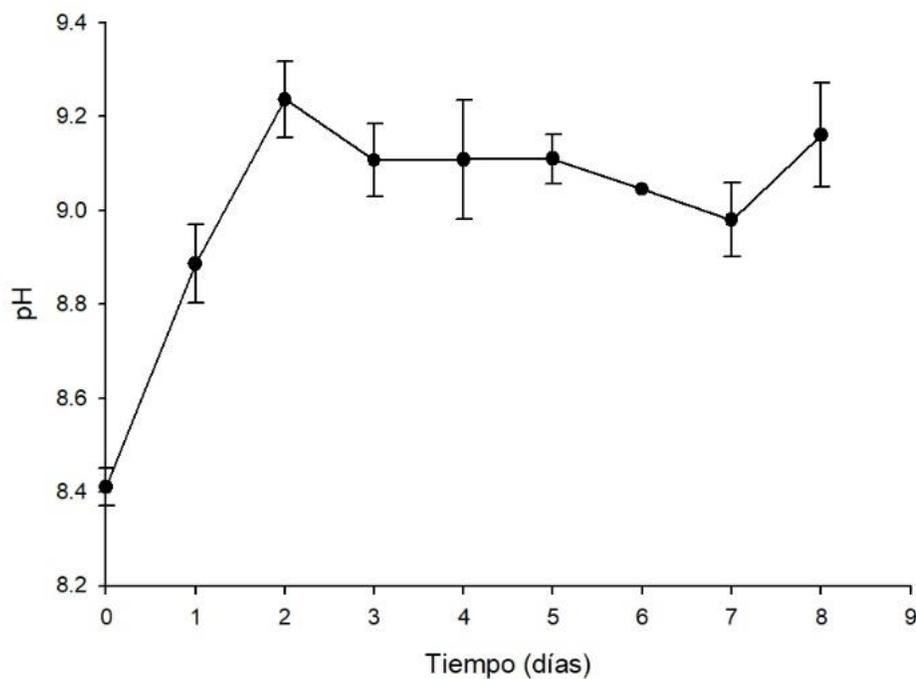
Se realizó un seguimiento al cultivo de *N. incerta* durante 8 días con el objetivo de caracterizar su curva de crecimiento. La densidad celular máxima del cultivo de *N. incerta* fue de  $6.31 \times 10^5$  células/mL (Figura 4) y la densidad óptica máxima a 680 nm fue de 0.199 nm (Figura 5), ambas se alcanzaron al octavo día. Los valores de pH oscilaron entre 8 y 9 (Figura 6).



**Figura 4.** Valores promedio y desviación estándar de la curva de crecimiento de *N. incerta*, mantenida en cultivos por lote en matraces Erlenmeyer con 100 mL en medio "f".



**Figura 5.** Valores promedio y desviación estándar de la curva de crecimiento de *N. incerta*, evaluada por densidad óptica a 680 nm, mantenida en cultivos por lote en matraces Erlenmeyer con 100 mL en medio "f".



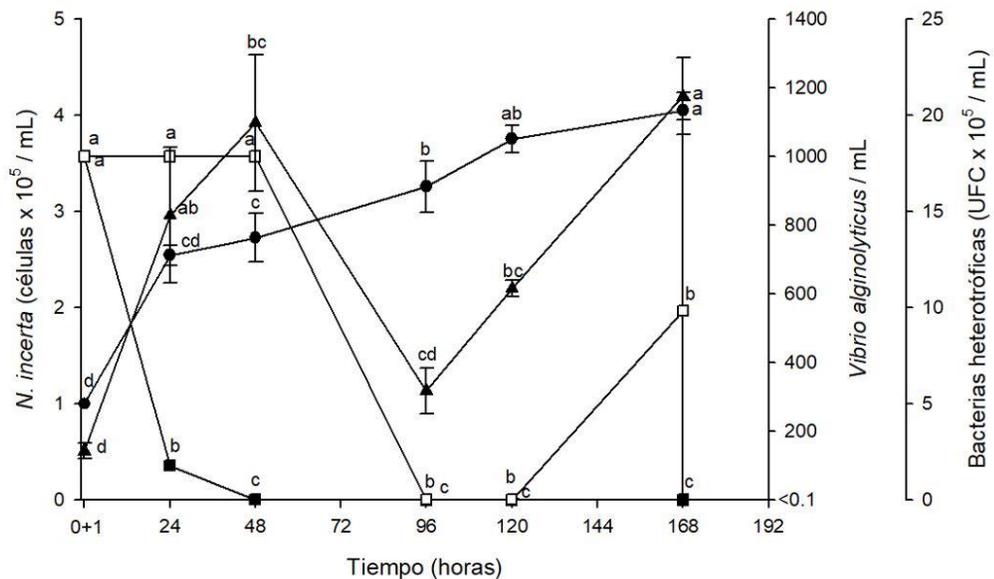
**Figura 6.** Valores promedio y desviación estándar del pH medido durante el crecimiento de *N. incerta*, mantenida en cultivos por lote en matraces Erlenmeyer con 100 mL en medio "f".

### 3.1.3 Inhibición del crecimiento de *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CICESE 04) y *V. harveyi* (DN 01/CICESE 597) por *N. incerta*

#### 3.1.3.1 Efecto inhibitorio de *N. incerta* contra *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CICESE 04)

Las densidades celulares máximas alcanzadas por *N. incerta* en cocultivo con *V. alginolyticus* fueron de  $4.05 \pm 0.10 \times 10^5$  células/mL a las 168 horas. Las bacterias heterótrofas en cocultivo presentaron valores de  $2.1 \pm 0.20 \times 10^6$  UFC/mL al séptimo día (Figura 7). Se realizaron mediciones de pH y este se mantuvo en valores entre 8 y 9.

La densidad de *Vibrio* a las 24 horas ( $100 V. alginolyticus$ /mL) y a las 48 horas los niveles fueron  $\leq 0.1 V. alginolyticus$ /mL. Sin embargo, el control experimental constituido por *V. alginolyticus* no se mantuvo en los niveles esperados, al presentar valores  $\leq 0.1 V. alginolyticus$ /mL a las 96 y 120 horas, además de un repunte a  $550 V. alginolyticus$ /mL para las 168 h. En la figura 7 se presentan los datos de filtrados de 10 mL, debido a que no se logró detectar *V. alginolyticus* en los sembrados en medio TCBS, tanto para el tratamiento control y el cocultivo.



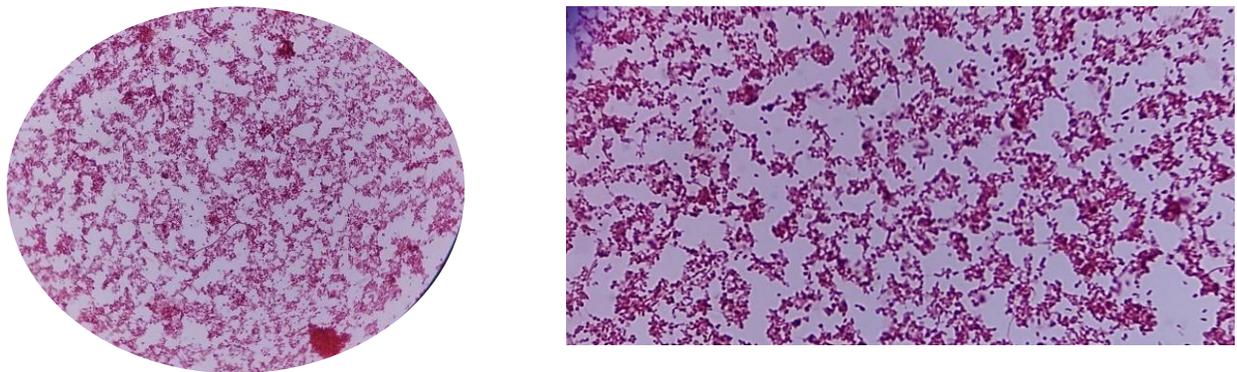
**Figura 7.** Reto de inhibición de *N. incerta* contra *V. alginolyticus*. *N. incerta* (●), *V. alginolyticus* (■), *V. alginolyticus* en medio "F" (□) y bacterias heterotróficas (▲). Filtrado de 10 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $n=3$ .

### 3.1.3.2 Estandarización del crecimiento de *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CICESE 04)

Para lograr el crecimiento de *V. alginolyticus* en sembrados en medio TCBS se utilizaron diferentes variables (salinidad al 0.89% y al 2.5%, inóculo al inicio de  $1 \times 10^4$  UFC/mL y  $1 \times 10^6$  UFC/mL, TCBS preparado de manera normal y TCBS con 3% de NaCl) y se monitoreó el crecimiento durante 168 h, obteniendo crecimiento únicamente en las 0+1 h post inoculación. Si bien se logró el crecimiento en filtrados, no se logró que la cepa creciera en medio TCBS al hacer diluciones y sembrados, por lo cual se procedió a realizar una tinción de Gram para verificar si la cepa tuviera algún tipo de contaminación.

### 3.1.3.3 Tinción de Gram *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CICESE 04)

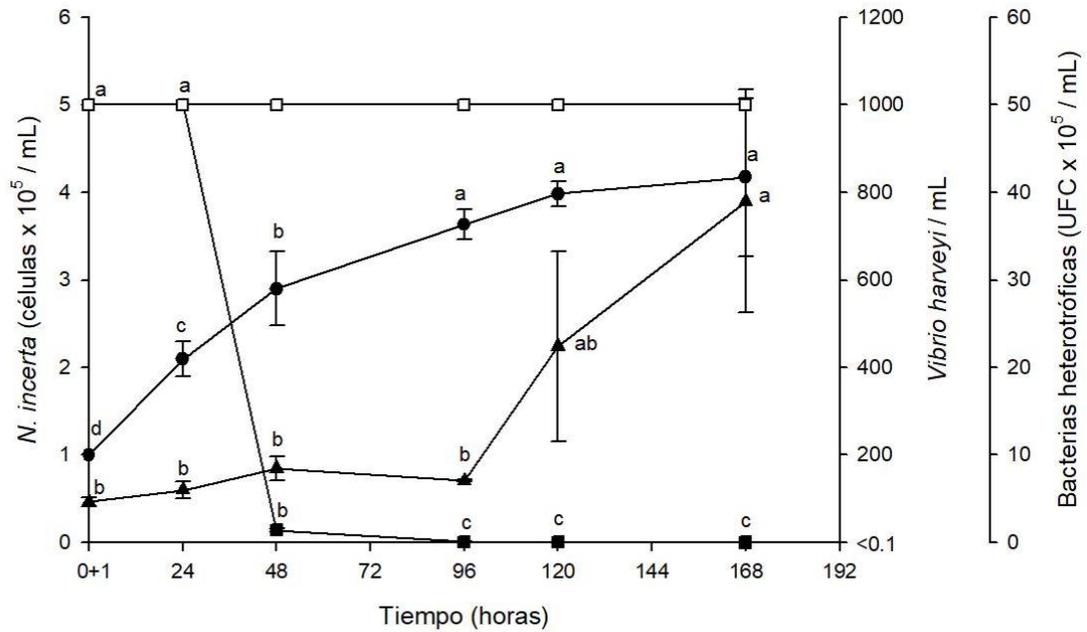
De acuerdo con las observaciones en el microscopio se constató que la cepa *V. alginolyticus* es Gram negativa (G-), ya que la muestra se tornó rosada (Figura 8). En cuanto a la morfología, no se detectaron diferencias. Por lo cual el bajo o nulo crecimiento de *V. alginolyticus* en sembrados de TCBS no se debe a la contaminación con otro microorganismo. Por lo que se considera que existe algún problema de crecimiento propio de la cepa y que no se pudo determinar para ninguno de los dos inóculos de la cepa ensayados.



**Figura 8.** Tinción de Gram de *V. alginolyticus* (CICESE 04).

### 3.1.3.4 Efecto inhibitorio de *N. incerta* contra *V. harveyi* (DN 01/CICESE 597)

Las densidades celulares máximas alcanzadas por *N. incerta* en cocultivo con *V. harveyi* fueron de  $4.17 \times 10^5$  células/mL a las 168 h (Figura 9).



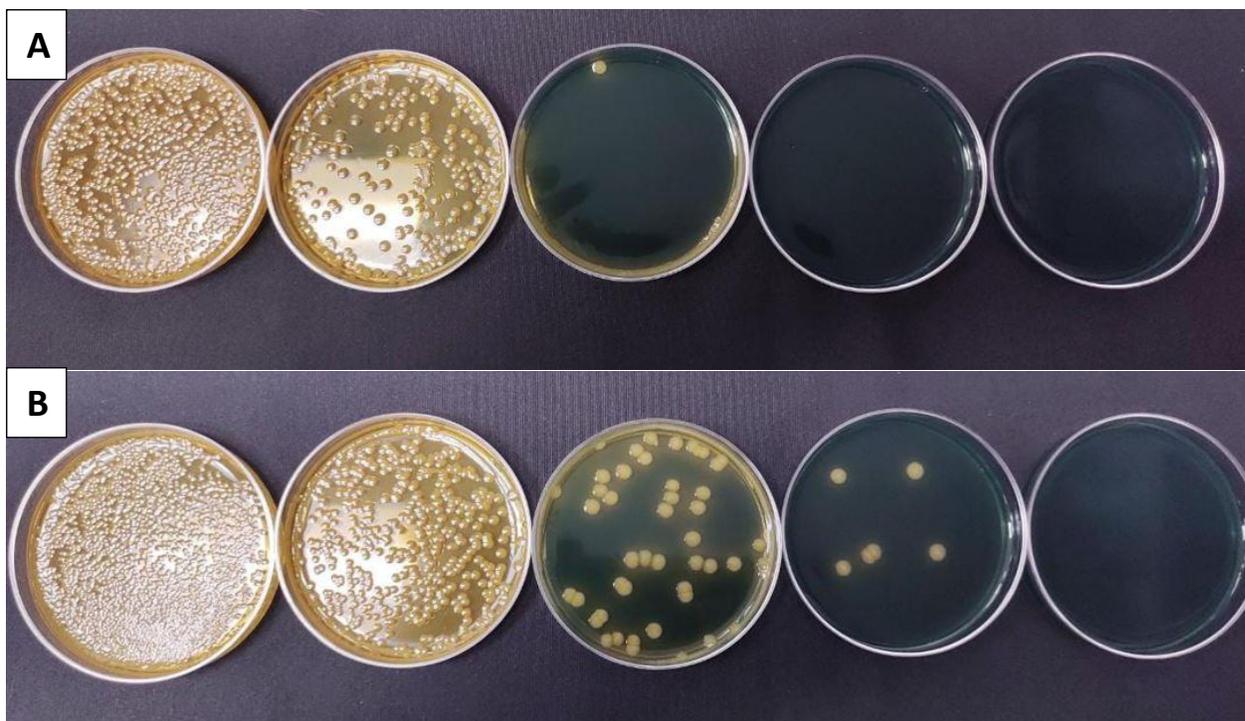
**Figura 9.** Reto de inhibición de *N. incerta* contra *V. harveyi*. *N. incerta* (●), *V. harveyi* (■), *V. harveyi* en medio "f" (□) y bacterias heterotróficas (▲). Filtrado de 1 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $n=3$ .

La inhibición de *V. harveyi* se observó al segundo día y para el cuarto día los niveles fueron  $\leq 0.1$  *V. harveyi*/mL. El control de *V. harveyi* cultivado en medio "f" mantuvo su densidad desde el inicio del experimento hasta el final del reto de inhibición al día 7, lo que demuestra que *V. harveyi* tiene la capacidad para crecer en este medio de cultivo (Figura 9). No se reportaron los resultados del sembrado en medio TCBS debido a que no hubo una uniformidad en los valores obtenidos para el control de *V. harveyi*.

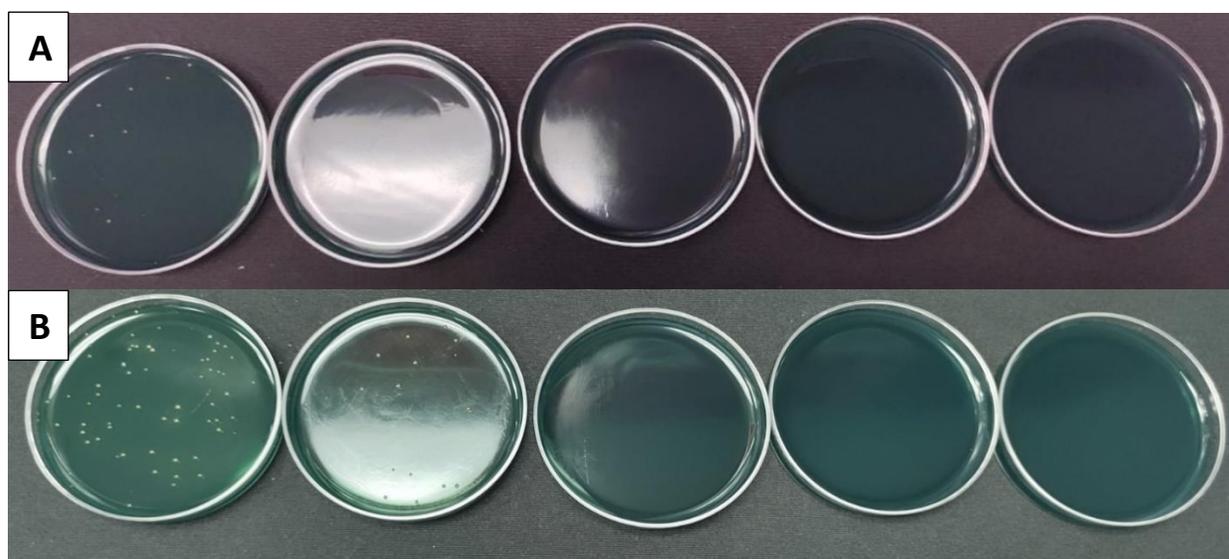
### 3.1.3.5 Estandarización del suero fisiológico para el crecimiento de *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CAIM 516) y *V. anguillarum* (CAIM 8)

Se decidió utilizar la cepa de *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CAIM 516) para los retos de inhibición posteriores debido a los problemas de crecimiento con la cepa de *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CICESE 04) reportados previamente. Por lo cual, se procedió a estandarizar la concentración de suero fisiológico necesaria para el crecimiento. Los resultados obtenidos mostraron que *V. alginolyticus* crece mejor con el suero fisiológico preparado con 25 g NaCl/L de agua destilada (Figura 10). Al utilizar suero fisiológico con 25 g NaCl/L se logaron detectar UFC de *Vibrio* hasta la dilución  $10^{-4}$  y hasta las 120 h post inoculación. Además, con esta mayor concentración de NaCl, se presentó mayor uniformidad en los conteos, mientras

que con el suero preparado de manera normal (8.9 g NaCl/L), únicamente se observaron vibrios a una dilución de  $10^{-3}$  y en algunos casos indetectables. Con base en los resultados anteriores, se tomó la decisión de trabajar con todas las cepas de *Vibrio* con el suero fisiológico preparado a 25 g NaCl/L.



**Figura 10.** *V. alginolyticus* sembrado a las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  en A) Suero fisiológico preparado 8.9 g NaCl/L de agua destilada y B) Suero fisiológico preparado con 25 g NaCl/L de agua destilada. Resultados a las 120 h.



**Figura 11.** *V. anguillarum* sembrado a las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  en A) Suero fisiológico preparado 8.9 g NaCl/L de agua destilada y B) Suero fisiológico preparado con 25 g NaCl/L de agua destilada. Resultados a las 0+1 h.

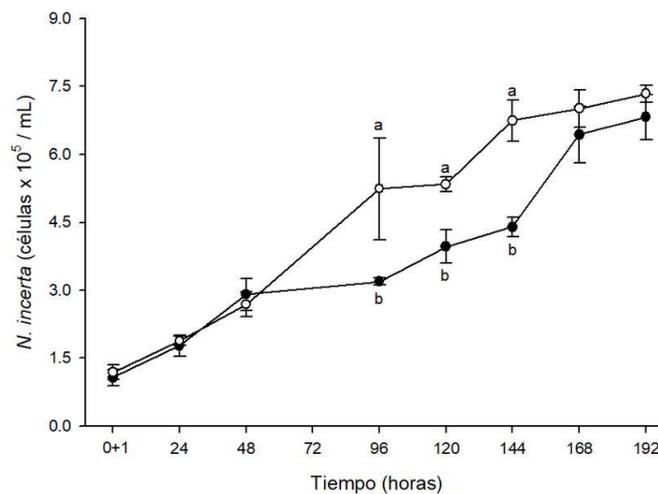
Para la cepa *V. anguillarum*, únicamente se lograron detectar 1800 *V. anguillarum*/mL para el suero al 0.89% y contrastantemente se obtuvo una concentración de 6,400 *V. anguillarum*/mL para el suero preparado con 2.5% a las 0+1 horas. Sin embargo, no se logró detectar crecimiento de *V. anguillarum* en los siguientes días de sembrado, por lo que se descartó esta especie para realizar los ensayos de inhibición (Figura 11).

## 3.2 Experimentación final

### 3.2.1 Inhibición del crecimiento de *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CAIM 516) por *N. incerta*

#### 3.2.1.1 Crecimiento de *N. incerta* en cocultivo con *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CAIM 516)

Se utilizó la cepa de *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CAIM 516) debido a los problemas de crecimiento con la cepa de *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CICESE 04) reportados anteriormente. Se evaluó el crecimiento celular de *N. incerta* sin inoculación de *Vibrio* spp. y en cocultivo con *V. alginolyticus*. Los valores máximos obtenidos por *N. incerta* a las 192 h, fueron de  $7.34 \pm 0.19 \times 10^5$  células/mL, mientras que en *N. incerta* en cocultivo presentó un valor máximo de  $6.82 \pm 0.50 \times 10^5$  células/mL. Las pruebas *t* de Student entre tratamientos para cada tiempo de medición indicaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para las 96, 120 y 144 horas (Figura 12).



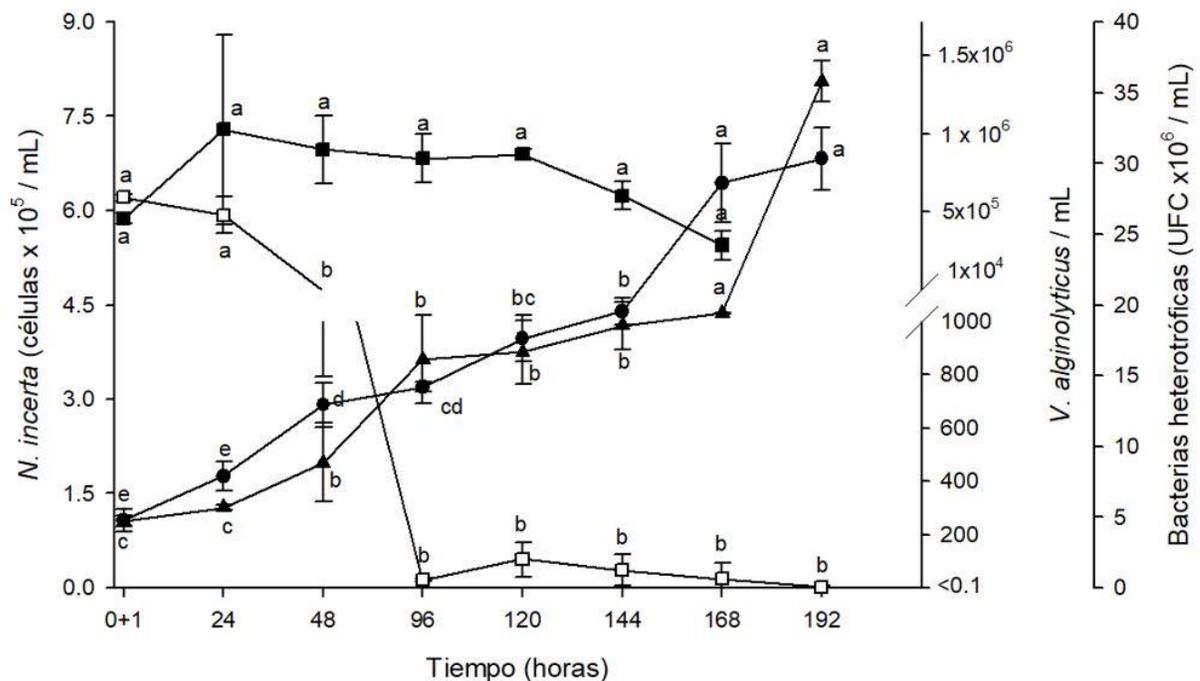
**Figura 12.** Curvas de crecimiento de *N. incerta*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de *N. incerta* en presencia o ausencia de *V. alginolyticus*. *N. incerta* (○), *N. incerta* en cocultivo con *V. alginolyticus* (●). Se realizó una prueba *t* de Student para cada tiempo y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ )  $a > b$ . Valores promedio  $\pm$  DE.  $n=3$ .

Se calculó la tasa de crecimiento y el tiempo de generación, obteniendo valores muy similares para las dos variables entre tratamientos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento y tiempo de generación de *N. incerta* en presencia y ausencia de *V. alginolyticus*. Prueba *t* de Student y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Valores promedio  $\pm$  DE.  $n=3$ .

Tratamiento	Tasa de crecimiento ( $\mu$ : divisiones/día)	Tiempo de generación (TG: días)
<i>N. incerta</i>	$0.33 \pm 0.02$	$3.04 \pm 0.21$
<i>N. incerta</i> + <i>V. alginolyticus</i>	$0.34 \pm 0.02$	$2.99 \pm 0.25$

### 3.2.1.2 Efecto inhibitorio de *N. incerta* contra *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CAIM 516)

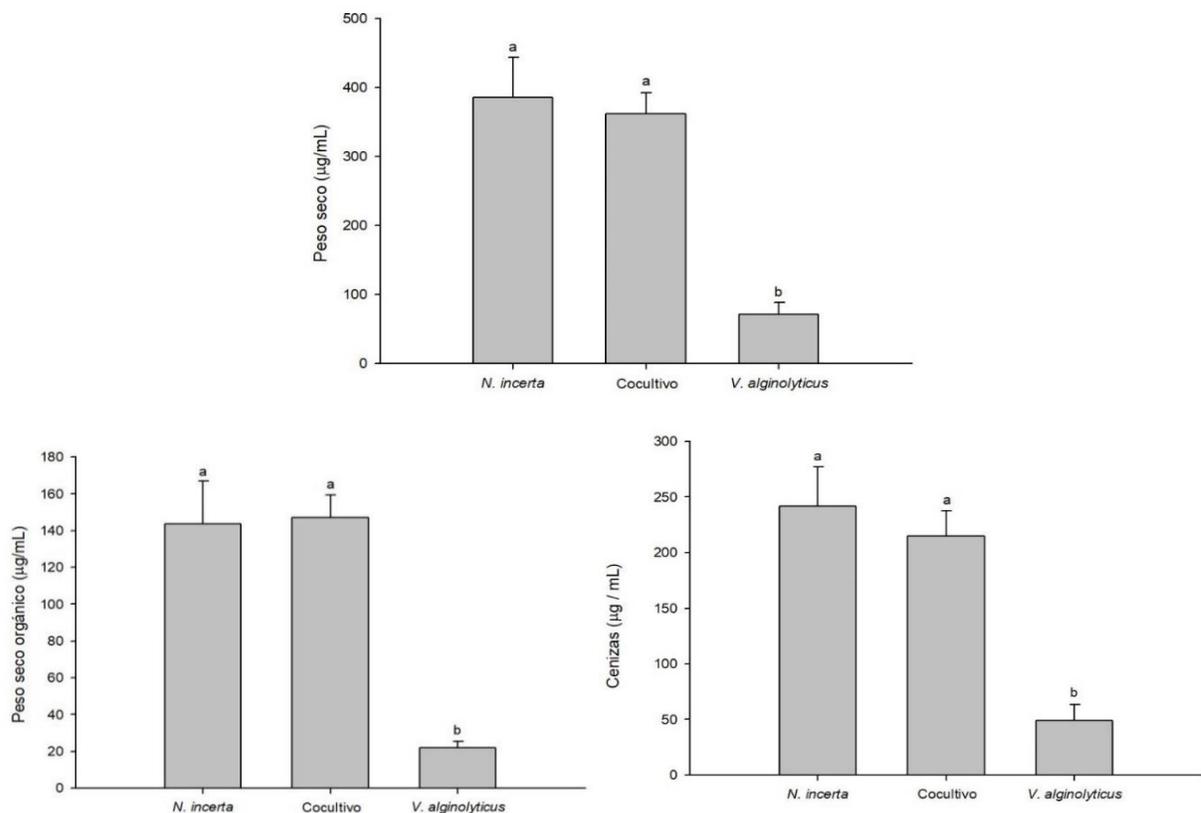


**Figura 13.** Reto de inhibición en cocultivo de *N. incerta* contra *V. alginolyticus*. *N. incerta* (●), *V. alginolyticus* (□), *V. alginolyticus* en medio "f" (■) y bacterias heterótrofas (▲). Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $n=3$ .

El valor máximo de la densidad celular fue alcanzado a las 192 h y fue de  $6.82 \pm 0.50 \times 10^5$  células/mL. Las bacterias heterótrofas llegaron a  $35.80 \pm 1.41 \times 10^6$  UFC/MI (Figura 13). Tanto en el tratamiento control de *V. alginolyticus* como en el cocultivo se reportan los valores de conteos resultantes de sembrados en caja

Petri con medio TCBS. El tratamiento control de *V. alginolyticus* se mantuvo en niveles superiores a  $1 \times 10^5$  UFC/mL, lo cual representa una concentración mucho mayor a lo esperado ( $1 \times 10^4$  UFC/mL). A pesar de ser un orden de magnitud mayor, la densidad de *V. alginolyticus*, se logró llegar a niveles menores a 110 *V. alginolyticus*/mL a partir de las 96 h. Si bien no se logró llegar a la inhibición total de *V. alginolyticus*, este reto representó un efecto inhibitorio de gran relevancia por parte de la especie de diatomea *N. incerta* y considerando que la concentración de *V. alginolyticus* al inicio del experimento fue de  $5 \times 10^5$  UFC/mL.

### 3.2.1.3 Peso seco total, contenido de cenizas y peso seco orgánico de *N. incerta*



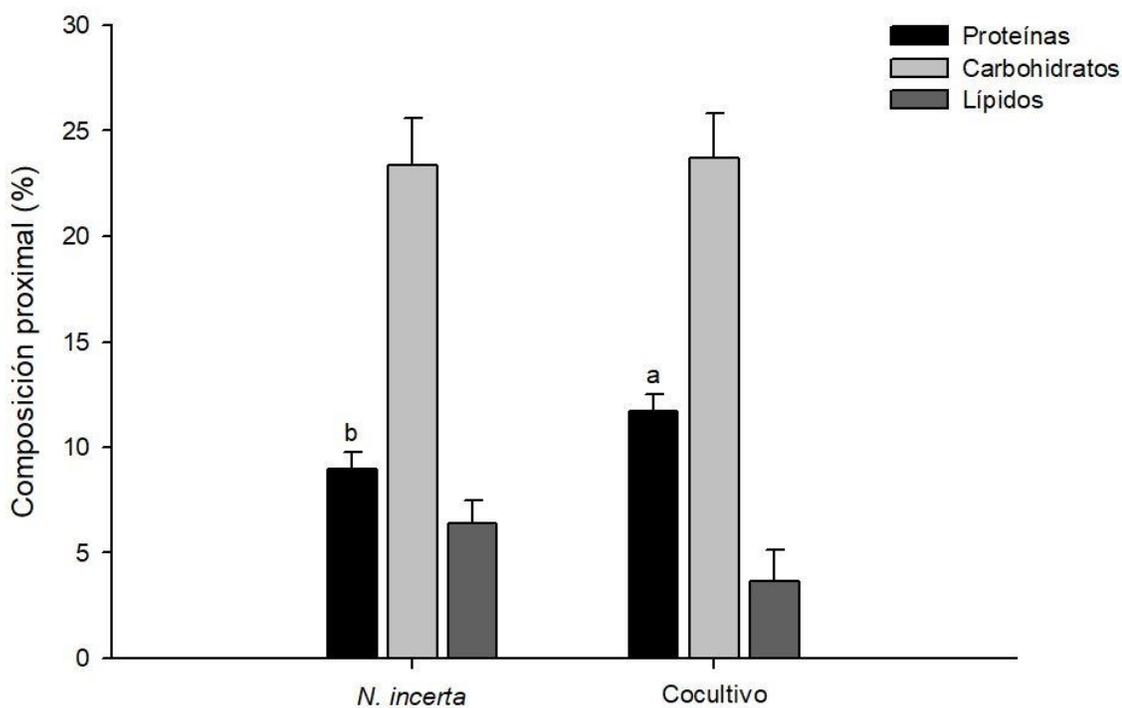
**Figura 14.** Valores de peso seco total, peso seco orgánico y cenizas para *N. incerta*, cocultivo y *V. alginolyticus*. ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $n=3$ .

Los valores promedio de peso seco total ( $p < 0.05$ ), peso seco orgánico ( $p < 0.05$ ) y contenido de cenizas ( $p < 0.05$ ) presentaron diferencias significativas entre *N. incerta* y *V. alginolyticus* y el cocultivo y *V. alginolyticus*. No se presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre *N. incerta* y el cocultivo. El mayor peso seco total se obtuvo en el monocultivo de *N. incerta* ( $385.48 \mu\text{g/mL}$ ). El mayor peso seco orgánico

(PSO) se observó en el cocultivo con un valor de 146.88  $\mu\text{g/mL}$ . Mientras que el mayor valor de cenizas se presentó en el cultivo de *N. incerta* (241.92  $\mu\text{g/mL}$ ), seguido del cocultivo (214.88  $\mu\text{g/mL}$ ) y el menor valor se presentó en el cultivo de *V. alginolyticus* (49.06  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 14).

### 3.2.1.4 Composición proximal de *N. incerta* en cocultivo con *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CAIM 516)

Se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el contenido de proteínas, con valores de  $11.69 \pm 0.80\%$  para el cocultivo y  $8.99 \pm 0.80\%$  para *N. incerta*. La adición de *V. alginolyticus* no presentó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) para los valores de carbohidratos y lípidos ( $p > 0.05$ ) (Figura 15).



**Figura 15.** Composición proximal de *N. incerta* y cocultivo. ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ . a>b. n=3.

### 3.2.1.5 Composición de ácidos grasos de *N. incerta*

En la Tabla 4, se muestra la composición de ácidos grasos de *N. incerta* (tratamiento control y cocultivo con *V. alginolyticus*), así como *V. alginolyticus* en el tratamiento control. En la mayoría de los ácidos grasos no se presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) por la adición de *V. alginolyticus*; presentándose valores totales similares para ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFAs) y poliinsaturados (PUFAs). Por el contrario, el cultivo de *V. alginolyticus* presentó un mayor porcentaje (71.14%) de ácidos grasos saturados (SFA).

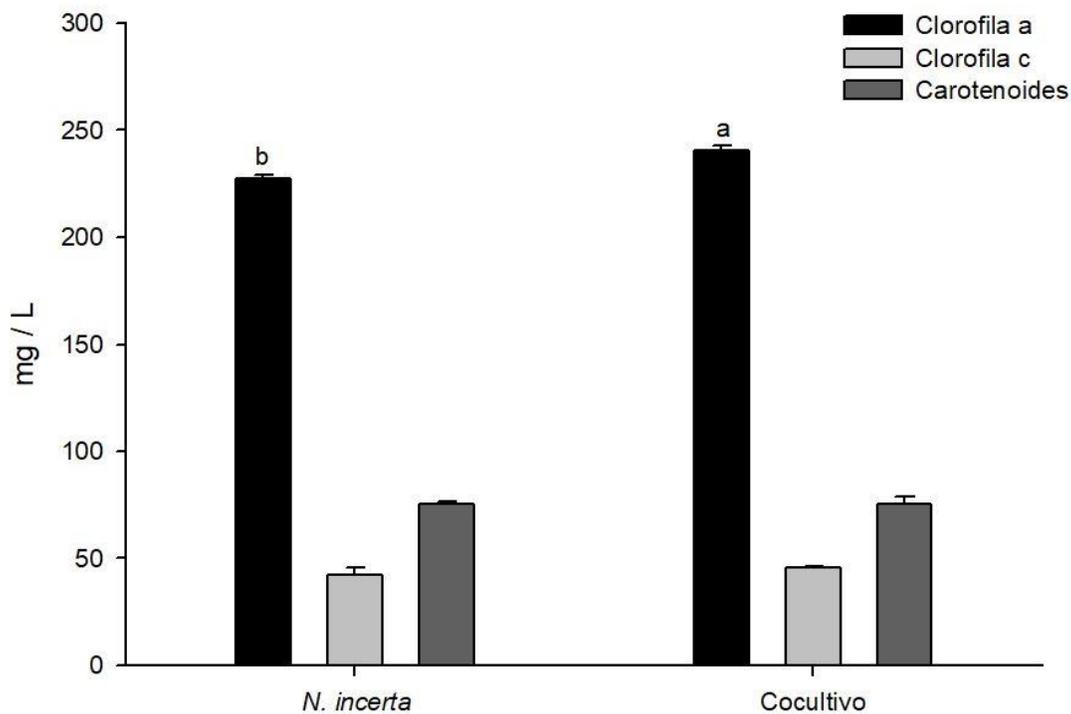
**Tabla 4.** Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de ácidos grasos de *N. incerta* en presencia o ausencia de *V. alginolyticus* y valores de *V. alginolyticus* en cultivo control (n=1).

Composición de ácidos grasos	<i>N. incerta</i>	<i>N. incerta</i> + <i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
<b>SFA</b>			
<b>C4:0</b>	0.50 ± 0.18 a	0.19 ± 0.00 b	7.37
<b>C10:0</b>	2.67 ± 0.04 a	1.03 ± 0.07 b	2.79
<b>C11:0</b>	0.01 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 a	0.13
<b>C12:0</b>	0.04 ± 0.01 a	0.03 ± 0.00 a	0.85
<b>C13:0</b>	0.22 ± 0.02 b	1.30 ± 0.28 a	4.67
<b>C14:0</b>	6.28 ± 0.32 a	6.09 ± 0.31 a	5.70
<b>C15:0</b>	0.22 ± 0.09 a	0.15 ± 0.00 a	0.86
<b>C16:0</b>	14.47 ± 0.20 a	13.77 ± 1.38 a	21.45
<b>C17:0</b>	8.62 ± 0.42 a	8.69 ± 0.71 a	3.58
<b>C18:0</b>	0.93 ± 0.08 a	0.90 ± 0.03 a	19.30
<b>C21:0</b>	0.58 ± 0.06 a	0.49 ± 0.12 a	2.83
<b>C22:0</b>	0.09 ± 0.03 a	0.05 ± 0.00 a	ND
<b>C23:0</b>	0.08 ± 0.01 a	0.07 ± 0.01 a	ND
<b>C24:0</b>	0.07 ± 0.01	ND	1.60
<b>MUFA</b>			
<b>C14:1n-5</b>	0.12 ± 0.05 a	0.06 ± 0.00 a	0.37
<b>C15:1</b>	0.05 ± 0.00 a	0.05 ± 0.01 a	ND
<b>C16:1n-7</b>	30.70 ± 0.71 a	31.02 ± 3.38 a	7.68
<b>C17:1</b>	ND	ND	0.70
<b>C18:1n-9 C</b>	1.05 ± 0.21	0.80 ± 0.26	8.79
<b>C18:1n-9 T</b>	0.34 ± 0.07 a	0.31 ± 0.04 a	0.60
<b>C22:1n-9</b>	1.17 ± 0.11 a	0.90 ± 0.10 a	ND
<b>C24:1n-9</b>	0.06 ± 0.00	ND	ND
<b>PUFA</b>			
<b>C18:2n-6 C</b>	0.89 ± 0.10 a	1.09 ± 0.45 a	0.11
<b>C18:2n-6 T</b>	0.06 ± 0.01 a	0.08 ± 0.00 a	0.49
<b>C18:3n-6</b>	1.44 ± 0.07 a	1.33 ± 0.21 a	0.87
<b>C20:2n-6</b>	0.12 ± 0.01 a	0.06 ± 0.01 a	0.01
<b>C20:3n-6</b>	1.48 ± 0.10 a	1.50 ± 0.10 a	1.87
<b>C20:4n-6</b>	0.48 ± 0.05 a	0.40 ± 0.10 a	2.33
<b>C20:5n-3</b>	27.20 ± 0.04 a	27.95 ± 1.31 a	4.09
<b>C22:6n-3</b>	0.06 ± 0.02	ND	0.95
<b>Total</b>			
<b>ΣSFA</b>	<b>34.78 %</b>	<b>32.78 %</b>	<b>71.14 %</b>
<b>ΣMUFA</b>	<b>33.50 %</b>	<b>33.14 %</b>	<b>18.14 %</b>
<b>ΣPUFA</b>	<b>31.72 %</b>	<b>32.41 %</b>	<b>10.72 %</b>

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

### 3.2.1.6 Cuantificación de pigmentos de *N. incerta*

La clorofila a (Chl-a) presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) por la adición de *V. alginolyticus*, se evaluó una mayor concentración de este pigmento en el cocultivo. La clorofila c (Chl-c) ( $p > 0.05$ ) y los carotenoides ( $p > 0.05$ ) no presentaron diferencias significativas entre el tratamiento con el monocultivo de *N. incerta* y el cocultivo (Figura 16).

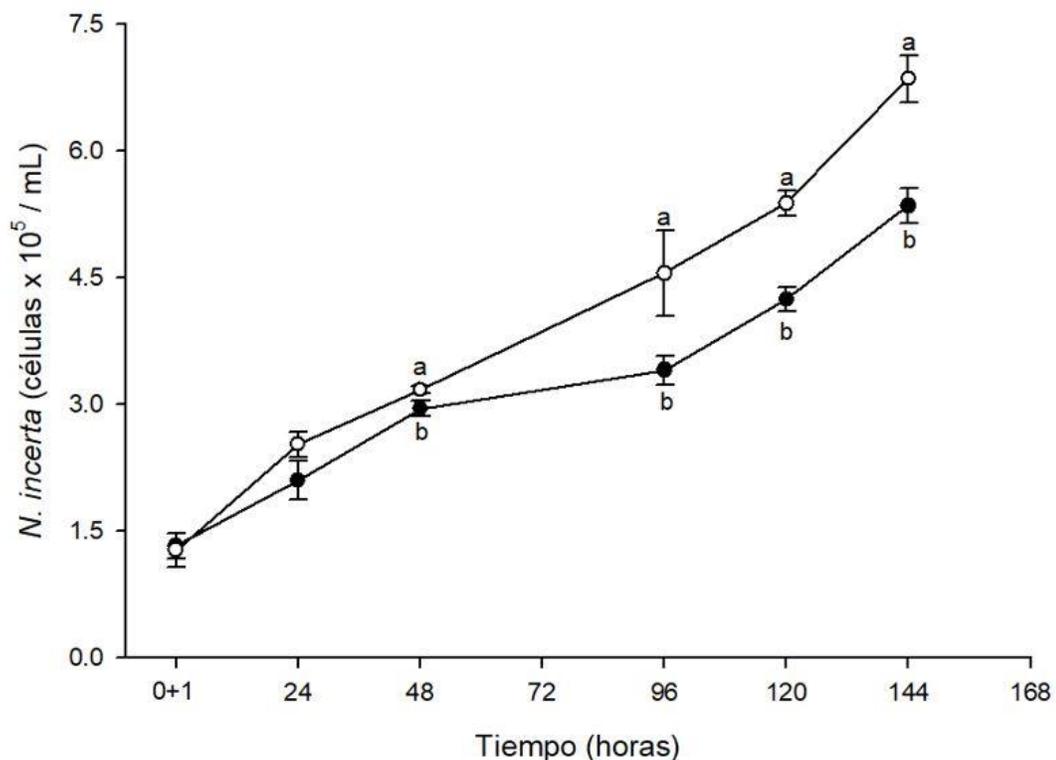


**Figura 16.** Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila a (Chl-a), clorofila c (Chl-c) y carotenoides (car) de *N. incerta* en presencia o ausencia de *V. alginolyticus* al finalizar el reto de inhibición. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) para cada grupo de pigmentos. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos:  $a > b$ .  $n = 3$ .

### 3.2.2 Inhibición del crecimiento de *V. harveyi* (DN 01/CICESE 597) por *N. incerta*

#### 3.2.2.1 Crecimiento de *N. incerta* en cocultivo con *V. harveyi* (DN 01/CICESE 597)

Se evaluó el crecimiento en densidad celular de *N. incerta* y en cocultivo con *V. harveyi* durante 144 h. Se observó un mayor crecimiento en el cultivo de *N. incerta*. Los valores máximos obtenidos por *N. incerta* a las 144 h, fueron de  $6.85 \pm 0.28 \times 10^5$  células/mL, mientras que en *N. incerta* en cocultivo con *V. harveyi* presentó un valor máximo de  $5.35 \pm 0.20 \times 10^5$  células/mL. Las pruebas entre tratamientos para cada tiempo de medición indicaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para las 48, 96, 120 y 144 horas (Figura 17).



**Figura 17.** Curvas de crecimiento de *N. incerta*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de *N. incerta* en presencia o ausencia de *V. harveyi*. *N. incerta* (○), *N. incerta* en cocultivo con *V. harveyi* (●). Se realizó una prueba *t* de Student para cada tiempo y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ )  $a > b$ . Valores promedio  $\pm$  DE.  $n=3$ .

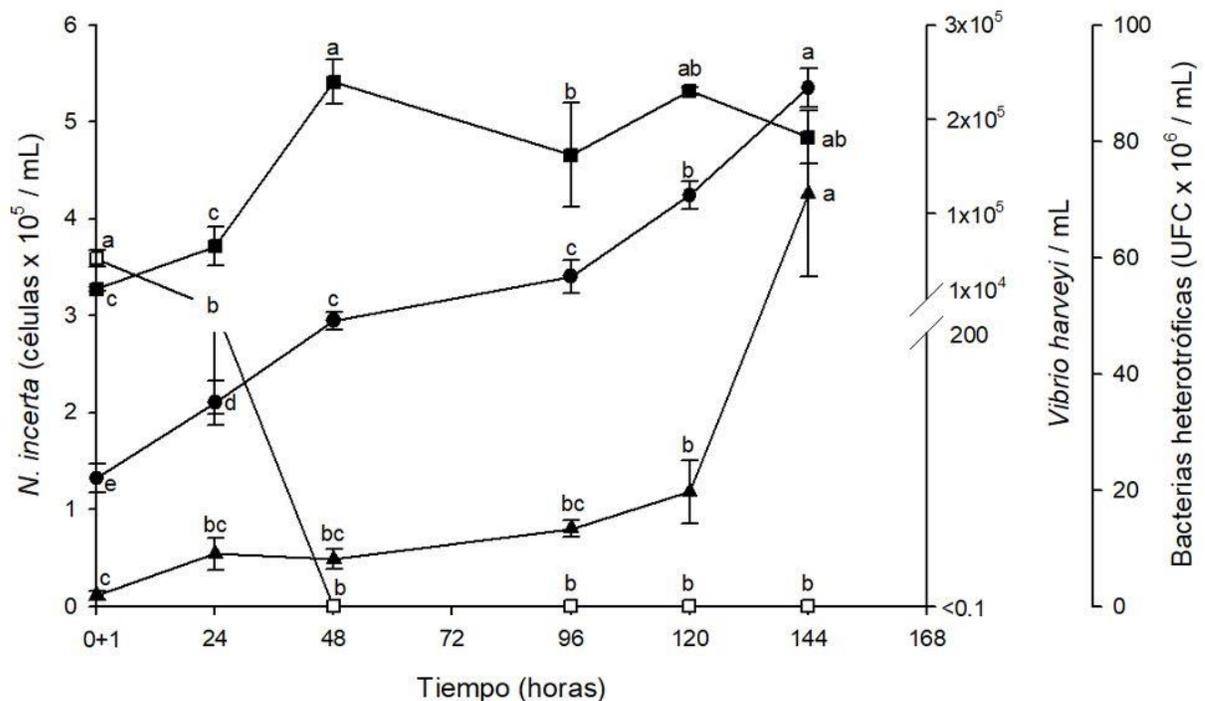
La tasa de crecimiento fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en el cultivo monoespecífico de *N. incerta* y el tiempo de generación fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) para el cocultivo (Tabla 5).

**Tabla 5.** Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento y tiempo de generación de *N. incerta* en presencia y ausencia de *V. harveyi*. Prueba *t* de Student y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ )  $a>b$ . Valores promedio  $\pm$  DE.  $n=3$ .

Tratamiento	Tasa de crecimiento ( $\mu$ : divisiones/día)	Tiempo de generación (TG: días)
<i>N. incerta</i>	$0.41 \pm 0.04$ a	$2.47 \pm 0.28$ b
<i>N. incerta</i> + <i>V. harveyi</i>	$0.34 \pm 0.03$ b	$2.98 \pm 0.29$ a

### 3.2.2.2 Efecto inhibitorio de *N. incerta* contra *V. harveyi* (DN01/CICESE 597)

La densidad celular máxima de *N. incerta* en cocultivo con *V. harveyi* se presentó a las 144 h y fue de  $5.35 \pm 0.20 \times 10^5$  células/mL. Las bacterias heterótrofas en cocultivo presentaron valores máximos de  $70.9 \pm 14.28 \times 10^6$  UFC/mL al sexto día. Se realizaron mediciones de pH y este se mantuvo en valores entre 8.7 y 9.2 (Figura 18).



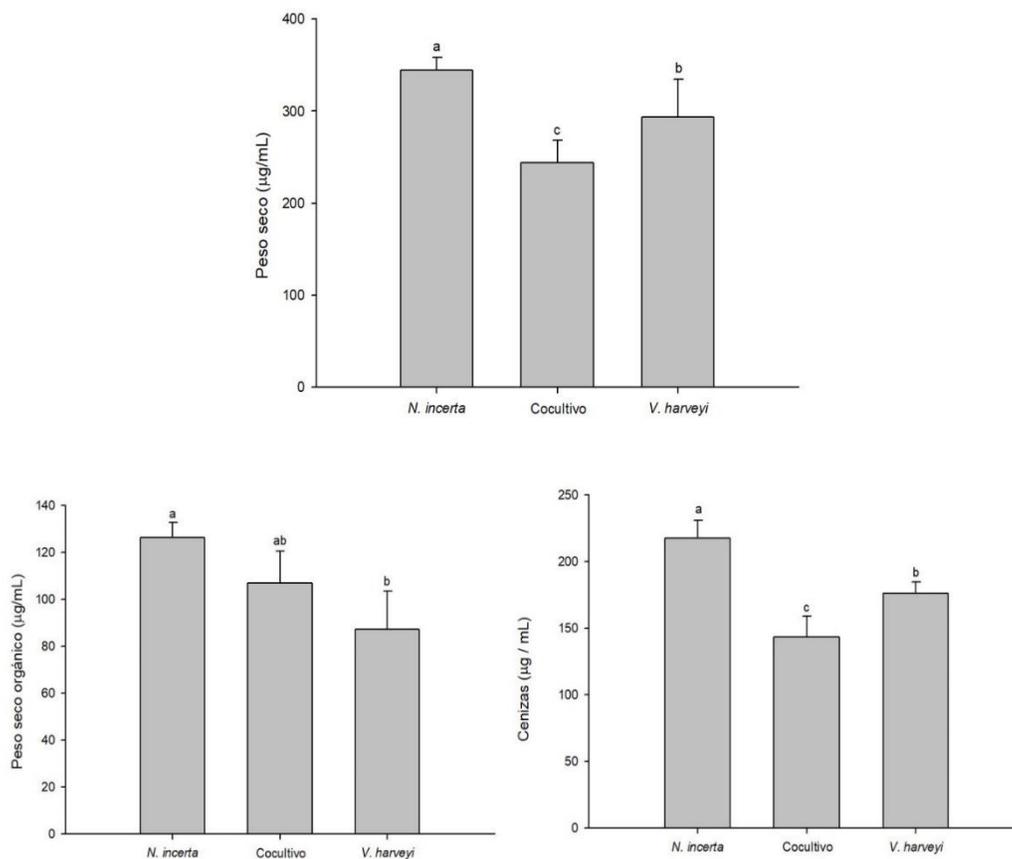
**Figura 18.** Reto de inhibición en cocultivo de *N. incerta* contra *V. harveyi*. *N. incerta* (●), *V. harveyi* (□), *V. harveyi* en medio "f" (■) y bacterias heterótrofas (▲). Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $n=3$ .

Tanto en el tratamiento control de *V. harveyi* como en el cocultivo se reportan los valores de conteos resultantes de sembrados en caja Petri con medio TCBS. El control de *V. harveyi* inició a una concentración

de  $2 \pm 0.24 \times 10^4$  UFC/mL, lo cual es el doble de lo esperado. Se obtuvo su valor máximo a las 48 h ( $2.39 \pm 0.23 \times 10^5$  UFC/mL) y se mantuvo en este orden de magnitud hasta finalizar al experimento ( $1.8 \pm 0.28 \times 10^5$  UFC/mL) a las 144h. Pese a haber inoculado con una densidad mayor a la esperada, se logró la inhibición total a las 48 h, manteniéndose hasta el final del reto de inhibición (144 h).

### 3.2.2.3 Peso seco total, contenido de cenizas y peso seco orgánico de *N. incerta*

Los valores promedio de peso seco total ( $p < 0.05$ ), peso seco orgánico ( $p < 0.05$ ) y contenido de cenizas ( $p < 0.05$ ) presentaron diferencias significativas para cada caso para los cultivos de *N. incerta*, los cocultivos con *V. harveyi* y solo *V. harveyi* (Figura 19). El mayor peso seco total se obtuvo en el cultivo monoespecífico de *N. incerta* ( $344.00 \mu\text{g/mL}$ ).



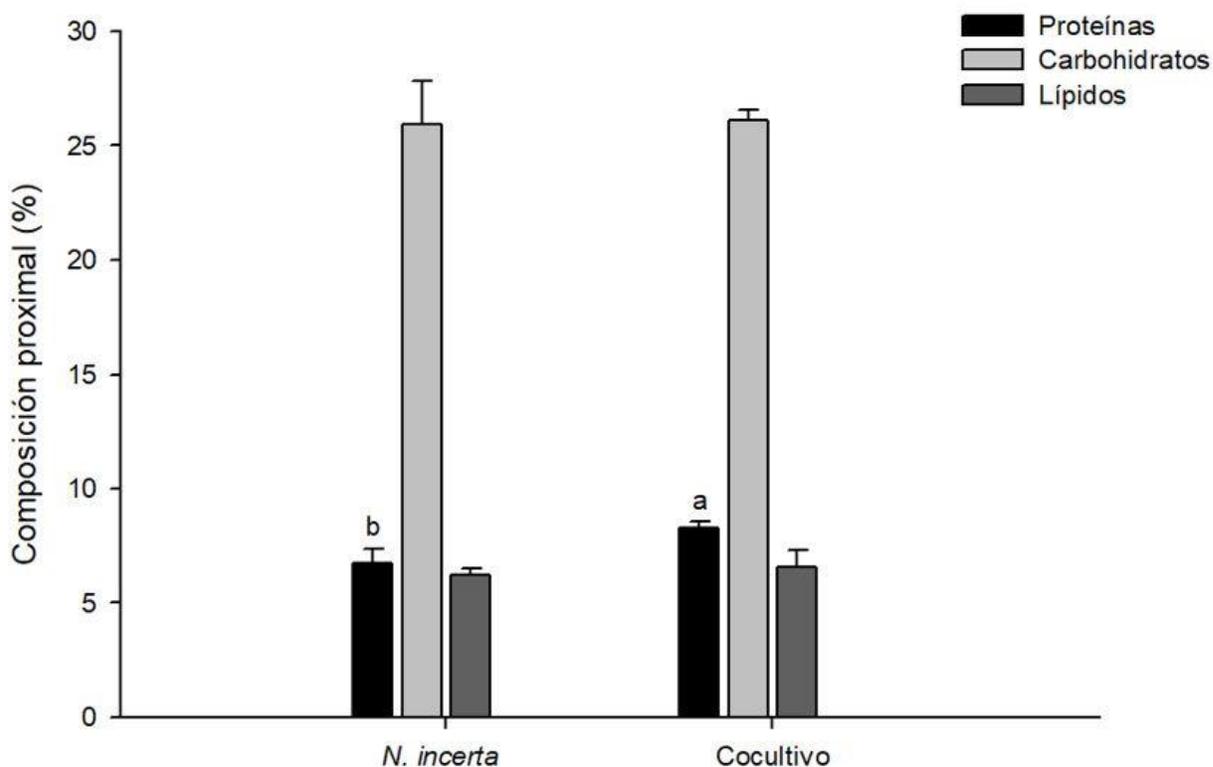
**Figura 19.** Valores de peso seco total, peso seco orgánico y cenizas para *N. incerta*, cocultivo y *V. harveyi*. ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $n=3$ .

El peso seco orgánico (PSO) presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos. La adición de *V. harveyi* disminuyó el peso seco orgánico comparado con el control de *N. laevis*. El mayor peso seco orgánico se observó en *N. incerta* con un valor de 126.51  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 19).

Para las cenizas, se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre todos los tratamientos. El mayor valor de cenizas se presentó en el cultivo de *N. incerta* (217.48  $\mu\text{g/mL}$ ), seguido de *V. harveyi* (176  $\mu\text{g/mL}$ ) y el menor valor se presentó en el cocultivo (143.22  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 19).

### 3.2.2.4 Composición proximal de *N. incerta* en cocultivo con *V. harveyi* (DN01/CICESE 597)

Se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los valores de proteínas, siendo el mayor el porcentaje en el cocultivo. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de carbohidratos ( $p > 0.05$ ) y lípidos ( $p > 0.05$ ) (Figura 20).



**Figura 20.** Composición proximal de *N. incerta* y cocultivo. ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ . a>b. n=3

### 3.2.2.5 Composición de ácidos grasos de *N. incerta* y *N. incerta* en cocultivo con *V. harveyi*

En la mayoría de los ácidos grasos no se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) por la adición de *V. harveyi*. Se observan valores totales similares para ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFAs) y poliinsaturados (PUFAs). Por el contrario, el cultivo de *V. harveyi* presentó un bajo porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (6.60%) (Tabla 6).

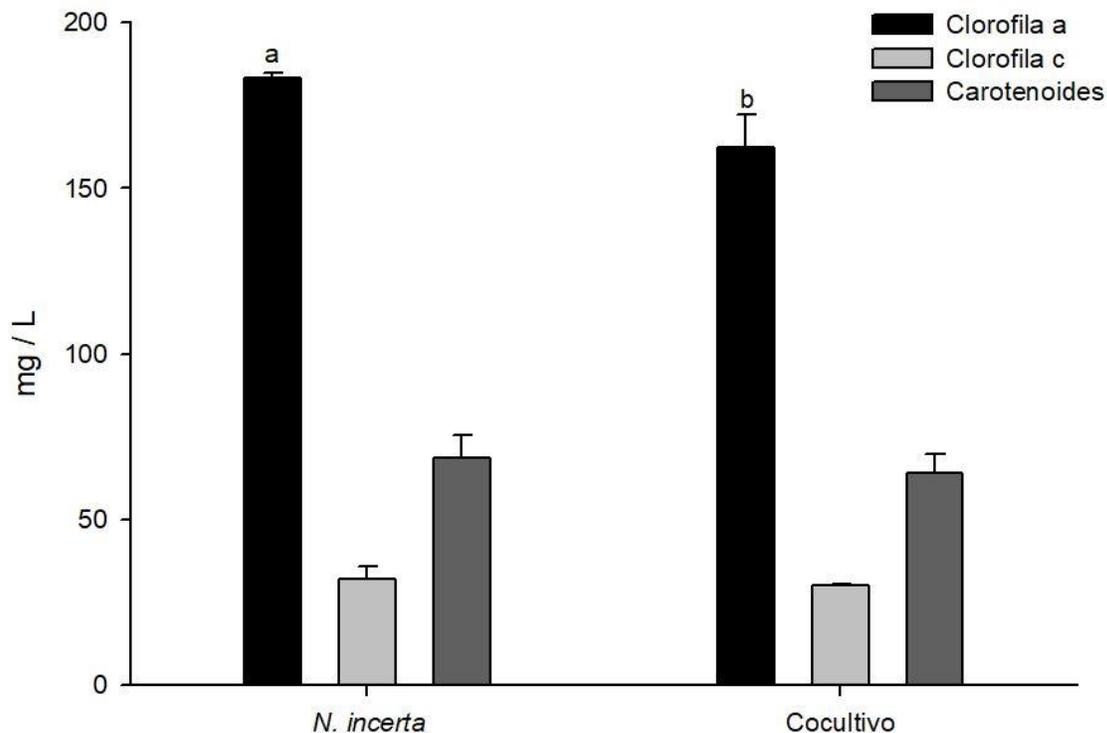
**Tabla 6.** Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de ácidos grasos de *N. incerta* en presencia o ausencia de *V. harveyi* y valores de *V. harveyi* en cultivo control (n=1).

Composición de ácidos grasos	<i>N. incerta</i>	<i>N. incerta</i> + <i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>
<b>SFA</b>			
<b>C4:0</b>	0.22 ± 0.06 b	0.89 ± 0.37 a	4.25
<b>C10:0</b>	6.81 ± 0.89 a	4.32 ± 3.82 b	6.78
<b>C11:0</b>	0.08 ± 0.03 a	0.02 ± 0.01 b	0.10
<b>C12:0</b>	ND	0.24 ± 0.12	0.42
<b>C13:0</b>	0.71 ± 0.25 a	0.63 ± 0.37 a	1.88
<b>C14:0</b>	6.38 ± 0.20 a	5.87 ± 0.28 a	3.38
<b>C15:0</b>	0.19 ± 0.05 a	0.19 ± 0.05 a	0.59
<b>C16:0</b>	12.38 ± 1.63 a	0.94 ± 0.75 a	19.25
<b>C17:0</b>	8.71 ± 0.73 a	8.39 ± 0.43 a	1.37
<b>C18:0</b>	0.80 ± 0.13 a	0.91 ± 0.04 a	13.09
<b>C20:0</b>	ND	0.16 ± 0.10	1.66
<b>C21:0</b>	0.66 ± 0.06 a	0.35 ± 0.01 b	2.20
<b>C22:0</b>	ND	ND	0.38
<b>C23:0</b>	ND	0.06 ± 0.01	ND
<b>C24:0</b>	ND	0.10 ± 0.03	0.92
<b>MUFA</b>			
<b>C14:1n-5</b>	0.12 ± 0.04 a	0.16 ± 0.02 a	0.41
<b>C15:1</b>	ND	0.04 ± 0.00	ND
<b>C16:1n-7</b>	30.63 ± 1.31 a	30.72 ± 1.61 a	6.86
<b>C17:1</b>	ND	0.08 ± 0.02	0.54
<b>C18:1n-9 C</b>	0.81 ± 0.02 b	1.00 ± 0.02 a	25.70
<b>C18:1n-9 T</b>	0.31 ± 0.04 a	0.57 ± 0.31 a	1.86
<b>C22:1n-9</b>	0.73 ± 0.08 b	1.06 ± 0.11 a	1.63
<b>C24:1n-9</b>	ND	0.04 ± 0.01	0.12
<b>PUFA</b>			
<b>C18:2n-6 C</b>	0.79 ± 0.03 a	0.77 ± 0.08 a	0.35
<b>C18:2n-6 T</b>	0.23 ± 0.03 a	0.29 ± 0.05 a	ND
<b>C18:3n-6</b>	1.54 ± 0.18 a	1.46 ± 0.14 a	1.46
<b>C18:3n-3</b>	ND	0.20 ± 0.04	0.94
<b>C20:2n-6</b>	0.09 ± 0.01 a	0.14 ± 0.05 a	0.05
<b>C20:3n-6</b>	1.31 ± 0.04 b	1.80 ± 0.13 a	0.41
<b>C20:4n-6</b>	0.55 ± 0.05 a	0.28 ± 0.01 b	1.82
<b>C20:5n-3</b>	27.78 ± 1.43 a	28.29 ± 2.17 a	1.03
<b>C22:6n-3</b>	ND	0.03 ± 0.01	0.54
<b>Total</b>			
<b>ΣSFA</b>	<b>36.95 %</b>	<b>33.07 %</b>	<b>56.28 %</b>
<b>ΣMUFA</b>	<b>32.60 %</b>	<b>33.67 %</b>	<b>37.12 %</b>
<b>ΣPUFA</b>	<b>32.28 %</b>	<b>33.26 %</b>	<b>6.60 %</b>

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

### 3.2.2.6 Cuantificación de pigmentos de *N. incerta*

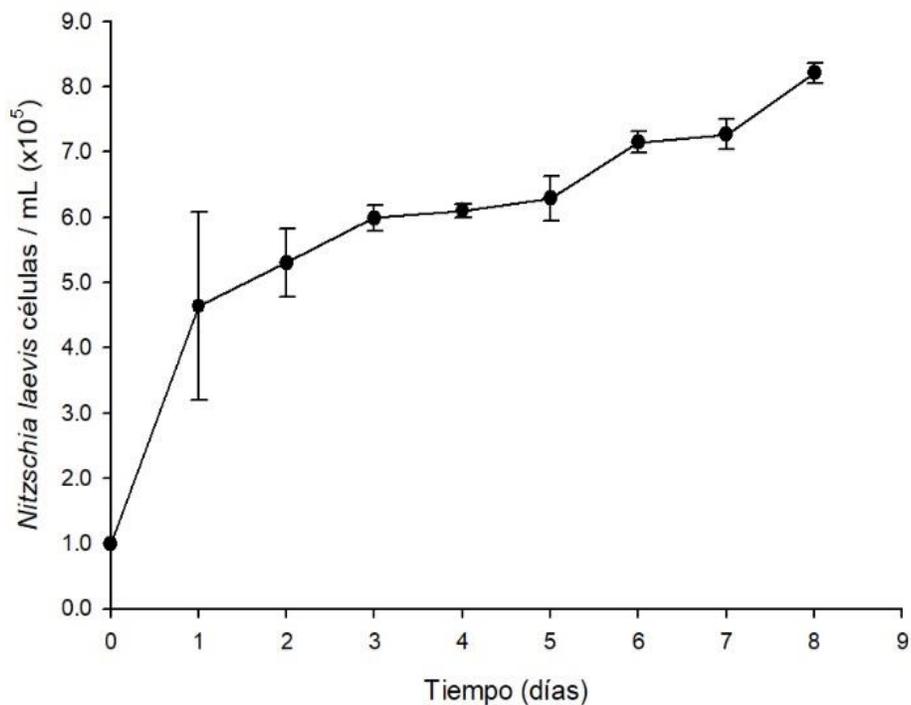
El contenido de clorofila a (Chl-a) presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el tratamiento control y el cocultivo, se observó una mayor concentración en el cultivo de *N. incerta*. No se presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre el tratamiento control y el cocultivo para el contenido de clorofila c (Chl-c) y carotenoides (Figura 21).



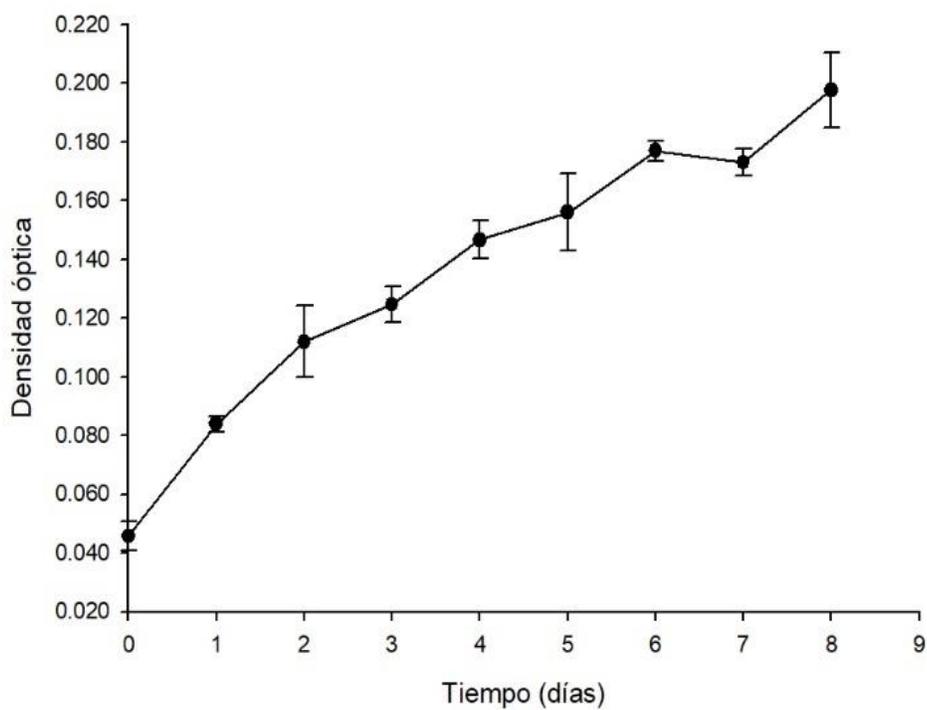
**Figura 21.** Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila a (Chl-a), clorofila c (Chl-c) y carotenoides (car) de *N. incerta* en presencia o ausencia de *V. harveyi* al finalizar el reto de inhibición. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) para cada grupo de pigmentos. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos:  $a > b$ .  $n = 3$ .

### 3.2.3 Caracterización de la curva de crecimiento de *N. laevis*

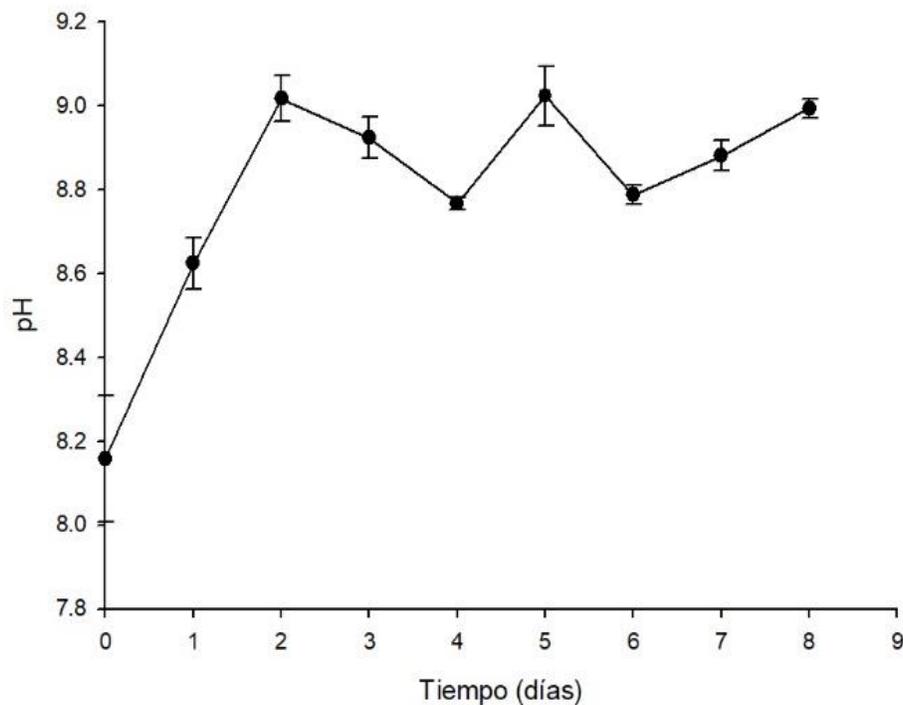
Se realizó un seguimiento al cultivo de *N. laevis* durante 8 días para caracterizar su crecimiento. La densidad celular máxima del cultivo de *N. laevis* fue de  $8.21 \times 10^5$  células/mL (Figura 22) y la densidad óptica máxima a 680 nm fue de 0.197 nm (Figura 23), ambas se alcanzaron al octavo día. Los valores de pH oscilaron entre 8 y 9 (Figura 24).



**Figura 23.** Valores promedio y desviación estándar de la curva de crecimiento de *N. laevis*, mantenida en cultivos por lote en matraces Erlenmeyer con 100 mL en medio "f".



**Figura 22.** Valores promedio y desviación estándar de la curva de crecimiento de *N. laevis*, evaluada por densidad óptica a 680 nm, mantenida en cultivos por lote en matraces Erlenmeyer con 100 mL en medio "f".

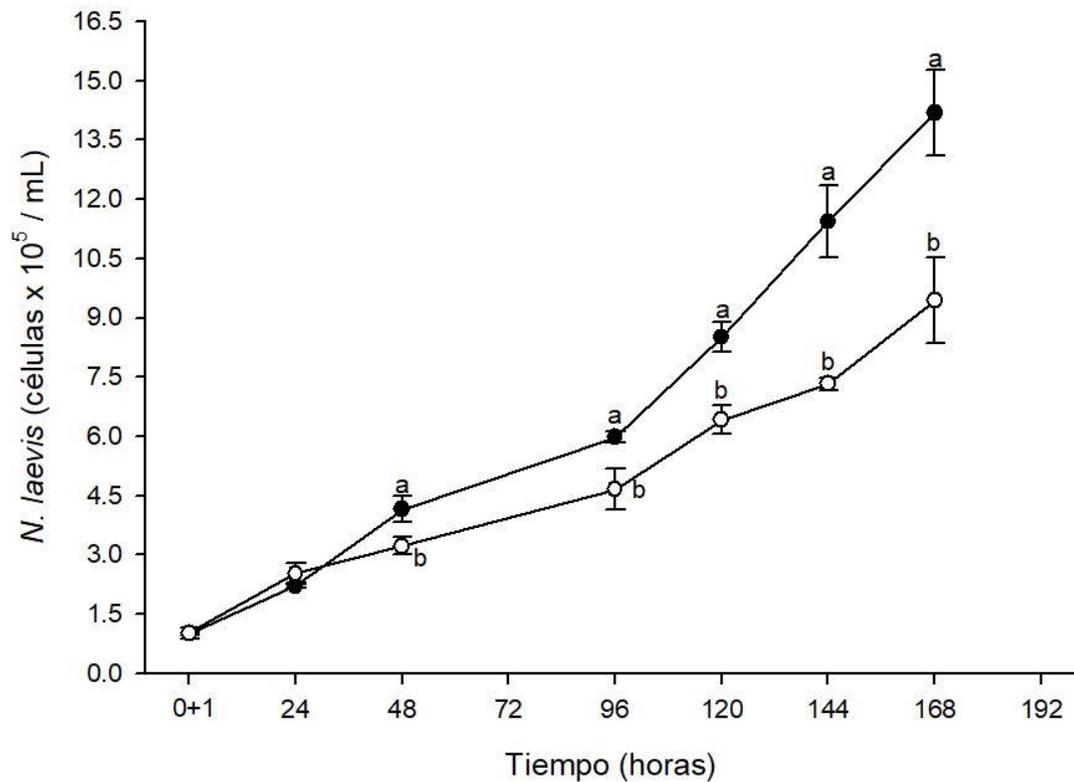


**Figura 24.** Valores promedio y desviación estándar del pH medido durante el crecimiento de *N. laevis*, mantenida en cultivos por lote en matraces Erlenmeyer con 100 mL en medio “f”.

### 3.2.4 Inhibición del crecimiento de *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CAIM 516) por *N. laevis*

#### 3.2.4.1 Crecimiento de *N. laevis* en cocultivo con *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CAIM 516)

Se utilizó la cepa de *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CAIM 516) debido a los problemas de crecimiento con la cepa de *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CICESE 04) reportados anteriormente. Al comparar el crecimiento de *N. laevis* en presencia o ausencia de *Vibrio*, se registraron valores promedio de  $9.44 \pm 1.08 \times 10^5$  células/mL para *N. laevis* con medio “f” y para los conteos de *N. laevis* en cocultivo el valor fue de  $14.19 \pm 1.08 \times 10^5$  células/mL, ambos se presentaron a las 168 h. Las pruebas *t* de Student entre tratamientos para cada día, presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) a las 48, 96, 120, 144 y 168 h (Figura 25).



**Figura 25.** Curvas de crecimiento de *N. laevis*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de *N. laevis* en presencia o ausencia de *V. alginolyticus*. *N. laevis* (○), *N. laevis* en cocultivo con *V. alginolyticus* (●). Se realizó una prueba t de Student para cada tiempo. a>b. Valores promedio  $\pm$  DE. n=3.

La tasa de crecimiento fue significativamente mayor para el cocultivo ( $p < 0.05$ ), mientras que el tiempo de generación fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) para el monocultivo de *N. laevis* (Tabla 7).

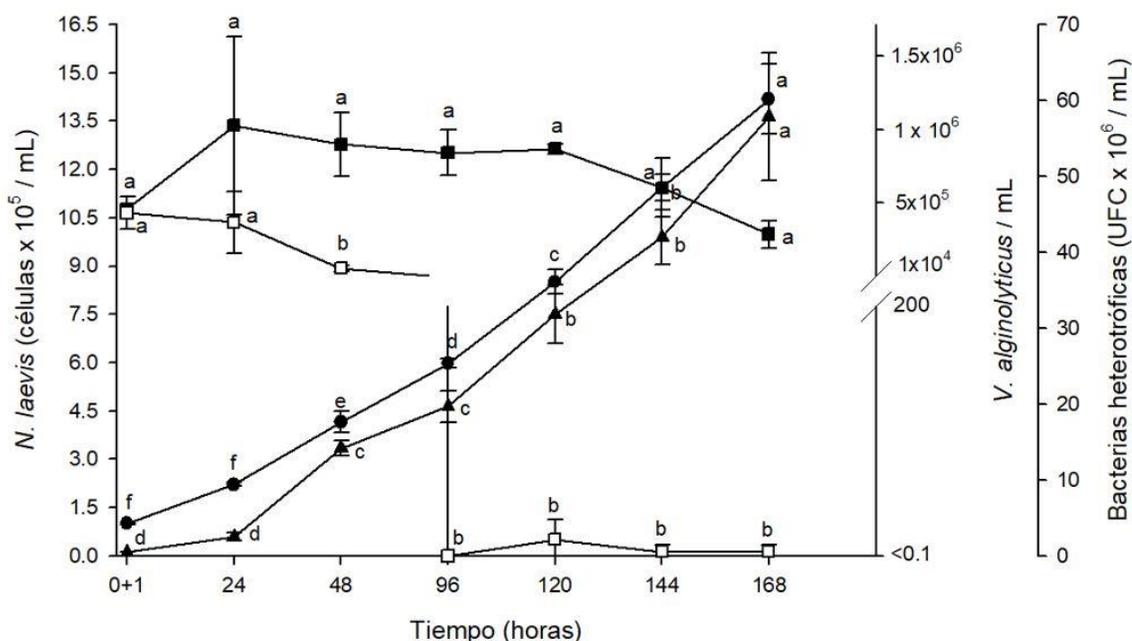
**Tabla 7.** Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento y tiempo de generación de *N. laevis* en presencia y ausencia de *V. alginolyticus*. Se realizó una prueba t de Student y prueba a posteriori de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). a>b. Valores promedio  $\pm$  DE. N=3.

Tratamiento	Tasa de crecimiento ( $\mu$ : divisiones/día)	Tiempo de generación (TG: días)
<i>N. laevis</i>	0.46 $\pm$ 0.01 b	2.17 $\pm$ 0.08 a
<i>N. laevis</i> + <i>V. alginolyticus</i>	0.55 $\pm$ 0.01 a	1.83 $\pm$ 0.04 b

### 3.2.4.2 Efecto inhibitorio de *N. laevis* contra *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CAIM 516)

El valor máximo de la densidad celular fue alcanzado a las 168 h y fue de  $14.19 \pm 1.08 \times 10^5$  células/mL. Las bacterias heterótrofas llegaron a  $57.87 \pm 8.45 \times 10^6$  UFC/mL. Tanto en el control de *V. alginolyticus* como en

el de cocultivo se reportan por conteos realizados en los sembrados en caja Petri con medio TCBS. El control de *V. alginolyticus* se mantuvo en niveles superiores a  $1 \times 10^5$  UFC/mL, lo cual representa una concentración mucho mayor a lo esperado ( $1 \times 10^4$  UFC/mL). A pesar de ser un orden de magnitud mayor la densidad de *V. alginolyticus*, se logró llegar a niveles menores a 10 *V. alginolyticus*/mL a partir de las 96 h. A pesar de un ligero incremento en su concentración a las 120 h es notorio el efecto inhibitorio por parte de *N. laevis*, máxime si se considera que la concentración al inicio del experimento fue de  $4.3 \times 10^5$  UFC/mL (Figura 26).

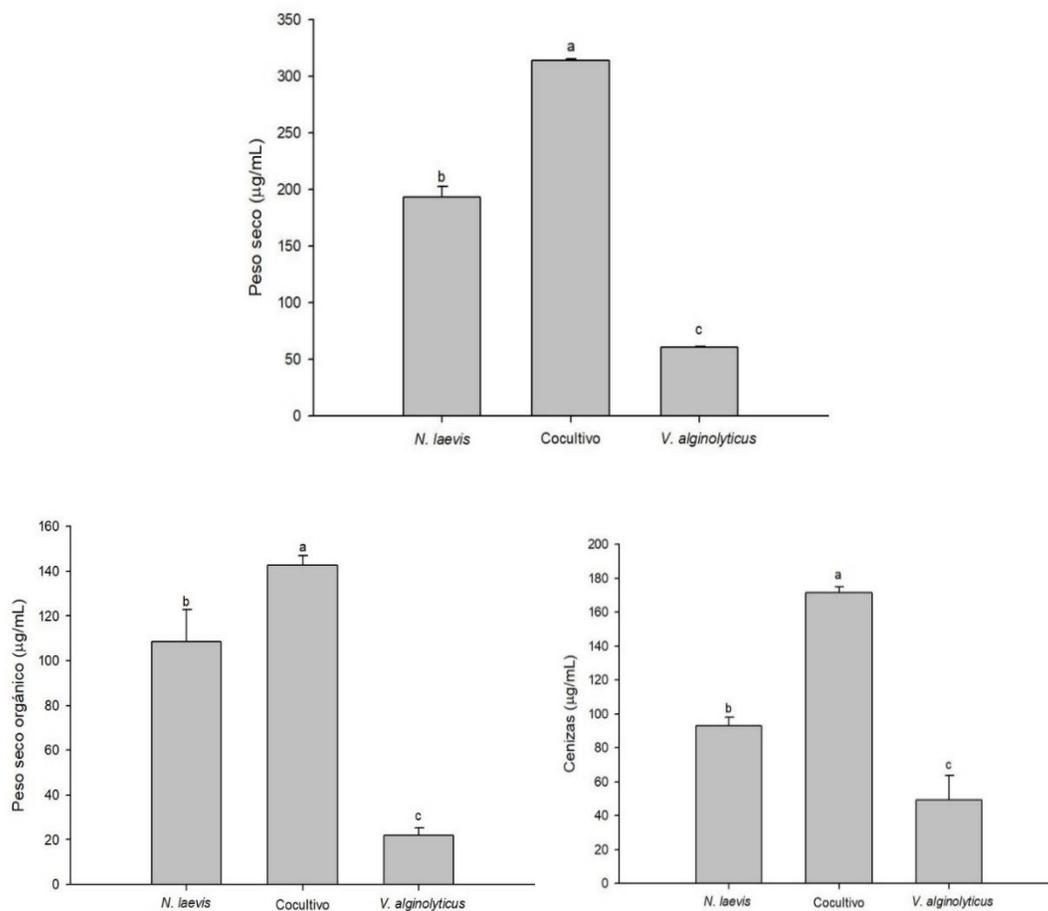


**Figura 26.** Reto de inhibición en cocultivo de *N. laevis* contra *V. alginolyticus*. *N. laevis* (●), *V. alginolyticus* (□), *V. alginolyticus* en medio "F" (■) y bacterias heterotróficas (▲). Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $n=3$ .

### 3.2.4.3 Peso seco total, contenido de cenizas y peso seco orgánico de *N. laevis*

Los valores promedio de peso seco total, peso seco orgánico y contenido de cenizas presentaron diferencias significativas para cada caso ( $p<0.05$ ) para los cultivos de *N. laevis*, los cocultivos con *V. alginolyticus* y solo *V. alginolyticus* y entre el cocultivo y *V. alginolyticus* (Figura 27). El significativamente mayor ( $p<0.05$ ) peso seco total se obtuvo en el cocultivo con *N. laevis* y *V. alginolyticus* ( $314.22 \mu\text{g/mL}$ ).

El peso seco orgánico (PSO) presentó diferencias significativas entre los tratamientos ( $p<0.05$ ). La adición de *V. alginolyticus* aumentó el peso seco orgánico comparado con el monocultivo de *N. laevis*. El mayor peso seco orgánico se observó en el cocultivo con un valor de  $142.51 \mu\text{g/mL}$ .

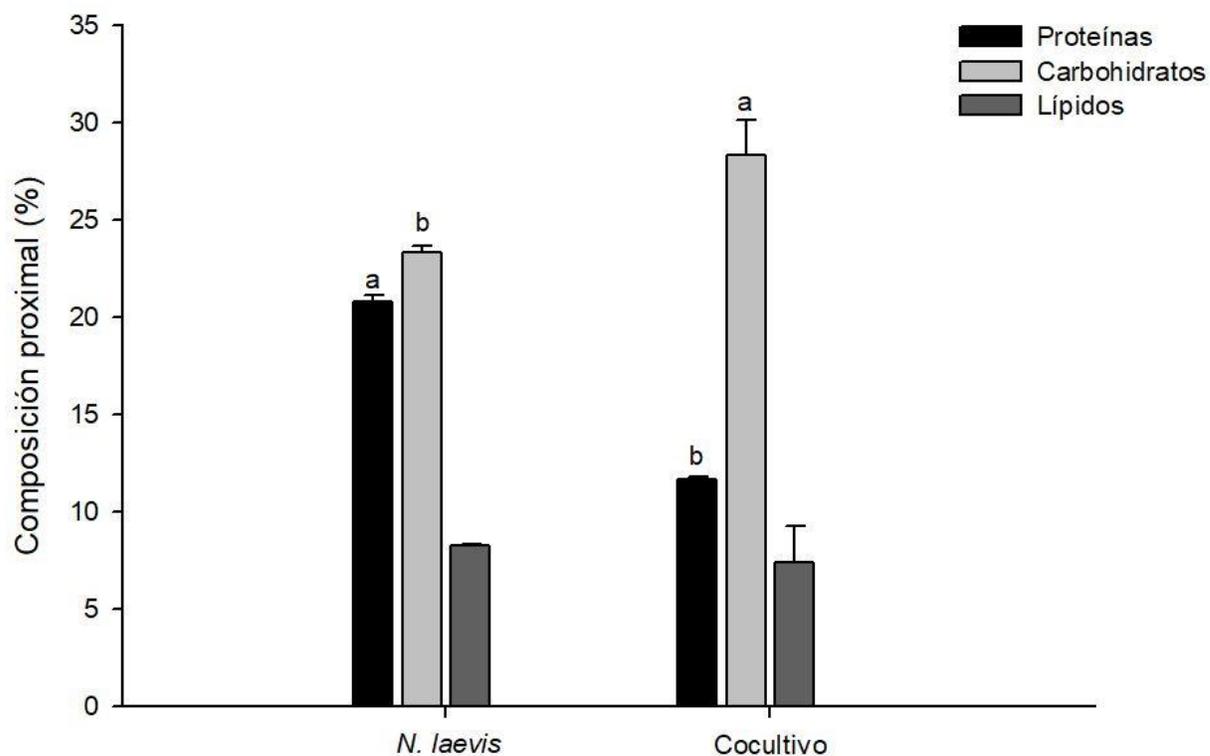


**Figura 27.** Valores de peso seco total, peso seco orgánico y cenizas para *N. laevis*, cocultivo y *V. alginolyticus*. ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $n=3$ .

Para las cenizas, se observaron diferencias significativas entre todos los tratamientos ( $p<0.05$ ). El mayor valor de cenizas se presentó en el cocultivo ( $171.55 \mu\text{g/mL}$ ), seguido del monocultivo de *N. laevis* ( $92.77 \mu\text{g/mL}$ ) y el menor valor se presentó en el tratamiento con *V. alginolyticus* ( $49.06 \mu\text{g/mL}$ ).

### 3.2.4.4 Composición proximal de *N. laevis* en cocultivo con *V. alginolyticus* (ATCC 17749/CAIM 516)

El cocultivo presentó un significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) porcentaje de carbohidratos y el cultivo de *N. laevis* tuvo un significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) porcentaje de proteínas (Figura 28).



**Figura 28.** Composición proximal de *N. laevis* y cocultivo. ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha = 0.05$ .  $n = 3$ .

### 3.2.4.5 Composición de ácidos grasos de *N. laevis*

En la mayoría de los valores totales de ácidos grasos se presentan datos similares, tanto para *N. laevis* y el cocultivo. Mientras que el cultivo de *V. alginolyticus* presentó un alto porcentaje de ácidos grasos saturados (SFAs) (71.14%) (Tabla 8).

**Tabla 8.** Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de ácidos grasos de *N. laevis* en presencia o ausencia de *V. alginolyticus* y valores de *V. alginolyticus* en cultivo control (n=1).

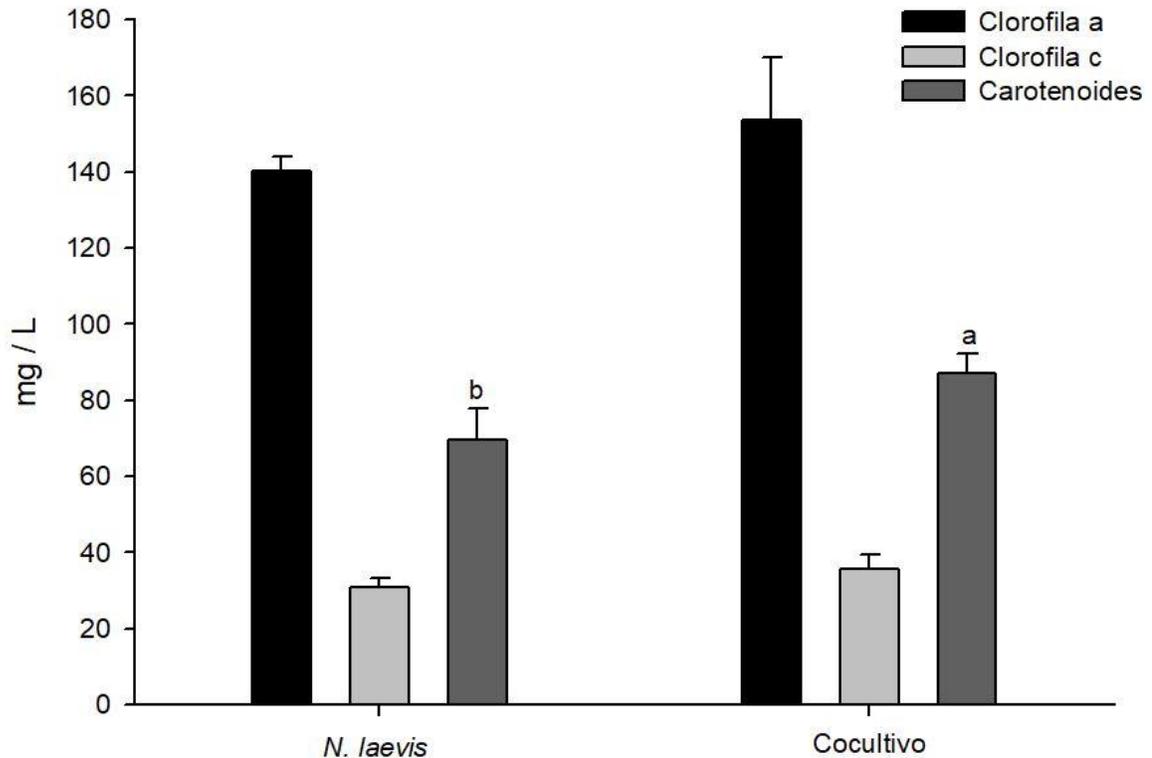
Composición de ácidos grasos	<i>N. laevis</i>	<i>N. laevis</i> + <i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
<b>SFA</b>			
<b>C4:0</b>	0.42 ± 0.23 a	0.25 ± 0.06 b	7.37
<b>C10:0</b>	1.37 ± 1.40 b	3.86 ± 1.63 a	2.79
<b>C11:0</b>	ND	0.01 ± 0.00	0.13
<b>C12:0</b>	0.03 ± 0.00 a	0.06 ± 0.05 a	0.85
<b>C13:0</b>	0.38 ± 0.12 b	1.39 ± 0.46 a	4.67
<b>C14:0</b>	9.25 ± 0.16 a	8.78 ± 0.24 b	5.70
<b>C15:0</b>	0.05 ± 0.05 b	0.60 ± 0.05 a	0.86
<b>C16:0</b>	9.75 ± 0.48 a	10.41 ± 0.11 a	21.45
<b>C17:0</b>	8.42 ± 0.47 a	7.89 ± 0.33 a	3.58
<b>C18:0</b>	1.37 ± 0.30 a	1.25 ± 0.20 a	19.30
<b>C20:0</b>	ND	0.16 ± 0.03	ND
<b>C21:0</b>	3.39 ± 0.51 a	2.11 ± 0.06 b	2.83
<b>C23:0</b>	ND	0.12 ± 0.02	ND
<b>C24:0</b>	2.02 ± 0.65 a	1.35 ± 0.02 a	1.60
<b>USFA</b>			
<b>C22:2</b>	0.25 ± 0.03 a	0.14 ± 0.02 a	ND
<b>MUFA</b>			
<b>C14:1n-5</b>	0.05 ± 0.05 a	0.07 ± 0.02 a	0.37
<b>C15:1</b>	ND	0.11 ± 0.00	ND
<b>C16:1n-7</b>	28.22 ± 0.60 a	30.95 ± 1.12 a	7.68
<b>C17:1</b>	0.05 ± 0.01 a	0.06 ± 0.01 a	0.70
<b>C18:1n-9 C</b>	1.31 ± 0.18 a	1.16 ± 0.03 a	8.79
<b>C18:1n-9 T</b>	0.75 ± 0.03 a	0.61 ± 0.07 a	0.60
<b>PUFA</b>			
<b>C18:2n-6 C</b>	0.72 ± 0.12 a	0.61 ± 0.04 a	0.11
<b>C18:2n-6 T</b>	1.63 ± 0.10 a	1.44 ± 0.19 a	0.49
<b>C18:3n-6</b>	1.93 ± 0.11 a	1.67 ± 0.04 a	0.87
<b>C18:3n-3</b>	ND	0.22 ± 0.06	ND
<b>C20:2n-6</b>	0.35 ± 0.02 a	0.40 ± 0.04 a	0.01
<b>C20:3n-6</b>	8.40 ± 1.48 a	9.65 ± 0.29 a	1.87
<b>C20:4n-6</b>	2.80 ± 0.42 a	1.74 ± 0.05 a	2.33
<b>C20:5n-3</b>	14.58 ± 0.68 a	13.26 ± 0.52 a	4.09
<b>C22:6n-3</b>	2.22 ± 0.47 a	1.24 ± 0.10 a	0.95
<b>Total</b>			
<b>ΣSFA</b>	<b>37.20 %</b>	<b>38.25 %</b>	<b>71.14 %</b>
<b>ΣUSFA</b>	<b>0.25 %</b>	<b>0.14 %</b>	<b>ND</b>
<b>ΣMUFA</b>	<b>30.38 %</b>	<b>32.96 %</b>	<b>18.14 %</b>
<b>ΣPUFA</b>	<b>32.62 %</b>	<b>30.22 %</b>	<b>10.72 %</b>

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

### 3.2.4.6 Cuantificación de pigmentos de *N. laevis*

Para la clorofila a (Chl-a) y clorofila c (Chl-c), no se presentaron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre el cultivo monoespecífico de *N. laevis* y el cocultivo; mientras que el contenido de carotenoides si presentó

diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el cocultivo y el cultivo mono-específico de *N. laevis*, obteniendo un mayor valor en el cocultivo (Figura 29).

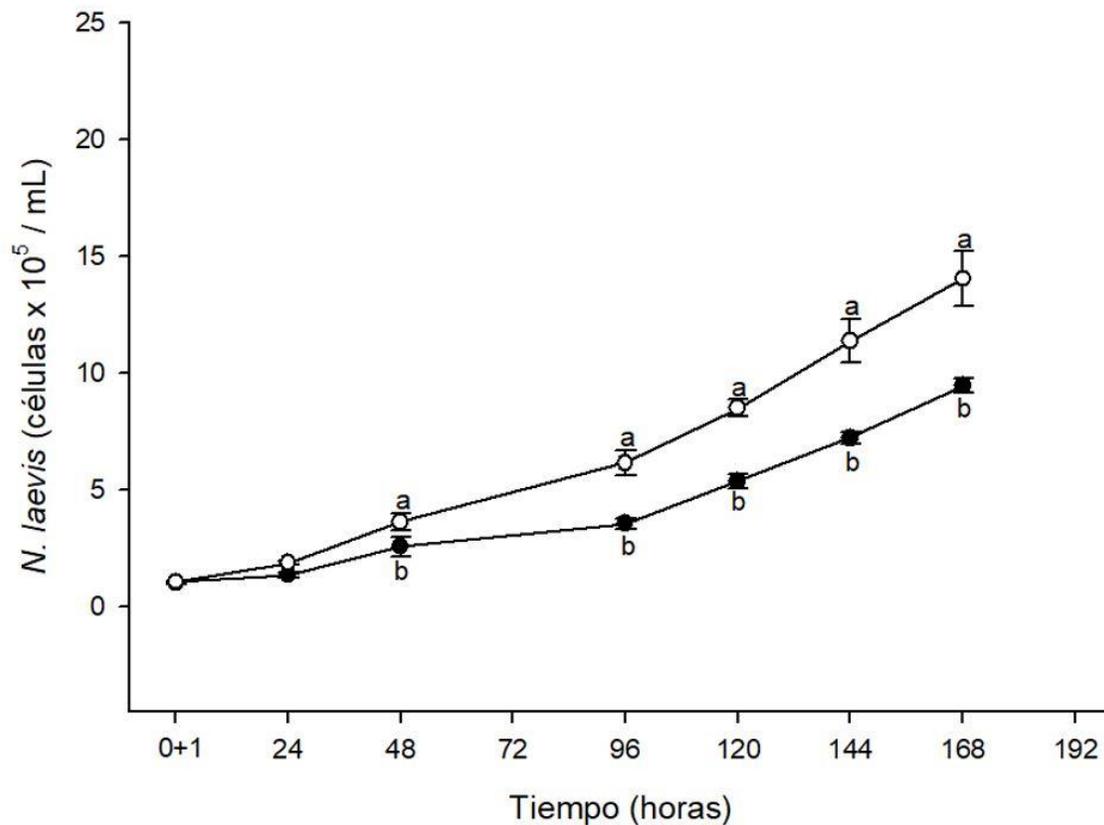


**Figura 29.** Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila a (Chl-a), clorofila c (Chl-c) y carotenoides (car) de *N. laevis* en presencia o ausencia de *V. alginolyticus* al finalizar el reto de inhibición. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) para cada grupo de pigmentos. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos:  $a > b$ .  $n = 3$ .

### 3.2.5 Inhibición del crecimiento de *V. harveyi* (DN01/CICESE 597) por *N. laevis*

#### 3.2.5.1 Crecimiento de *N. laevis* en cocultivo con *V. harveyi* (DN01/CICESE 597)

El crecimiento de *N. laevis* en cultivo mono-específico y en cocultivo se siguió durante todo el reto de inhibición (168 h), presentando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) a las 48, 96, 120, 144 y 168 h. Los valores máximos de densidad celular registrados para *N. laevis* fueron de  $14.03 \pm 1.17 \times 10^5$  células/mL y  $9.45 \pm 0.40 \times 10^5$  células/mL para el cocultivo (Figura 30).



**Figura 30.** Curvas de crecimiento de *N. laevis*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de *N. laevis* en presencia o ausencia de *V. harveyi*. *N. laevis* (○), *N. laevis* en cocultivo con *V. harveyi* (●). Se realizó una prueba *t* de Student para cada tiempo y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ )  $a>b$ . Valores promedio  $\pm$  DE.  $n=3$ .

La tasa de crecimiento fue significativamente mayor ( $p<0.05$ ) para el cultivo mono-específico de *N. laevis* y el tiempo de generación fue significativamente mayor para el cocultivo ( $p<0.05$ ) (Tabla 9).

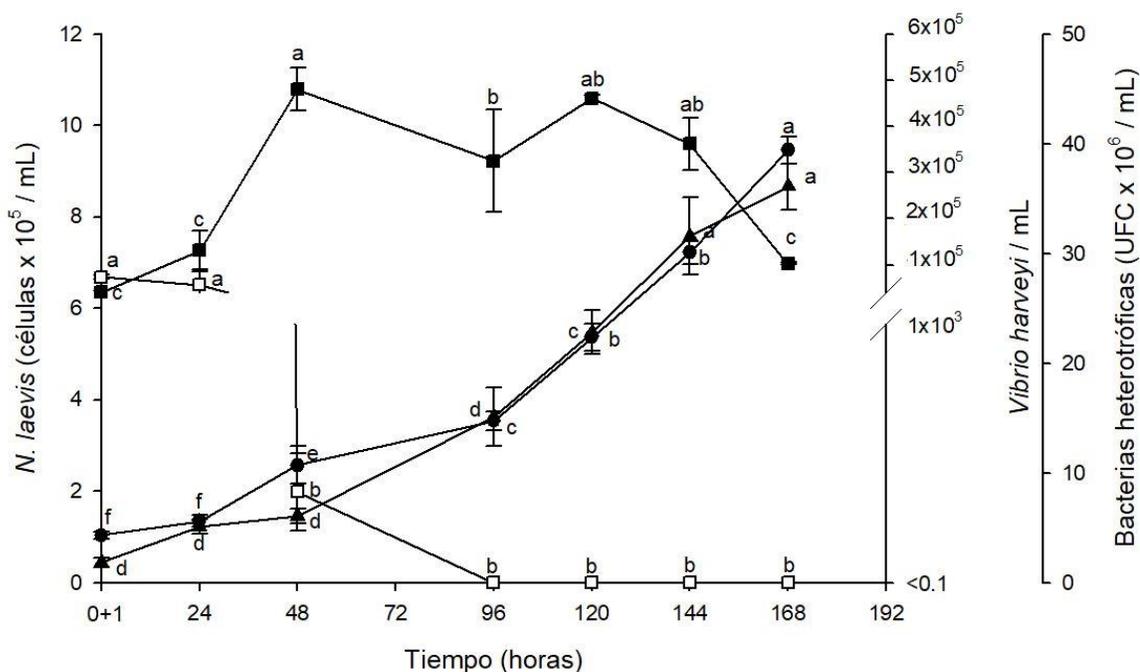
**Tabla 9.** Valores promedio y desviación estándar de la tasa de crecimiento y tiempo de generación de *N. laevis* en presencia y ausencia de *V. harveyi*.

Tratamiento	Tasa de crecimiento ( $\mu$ : divisiones/día)	Tiempo de generación (TG: días)
<i>N. laevis</i>	$0.53 \pm 0.02$ a	$1.88 \pm 0.08$
<i>N. laevis</i> + <i>V. harveyi</i>	$0.46 \pm 0.00$ b	$2.18 \pm 0.04$

Se realizó una prueba *t* de Student y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Valores promedio  $\pm$  DE.  $n=3$ .

### 3.2.5.2 Efecto inhibitorio de *N. laevis* contra *V. harveyi* (DN01/CICESE 597)

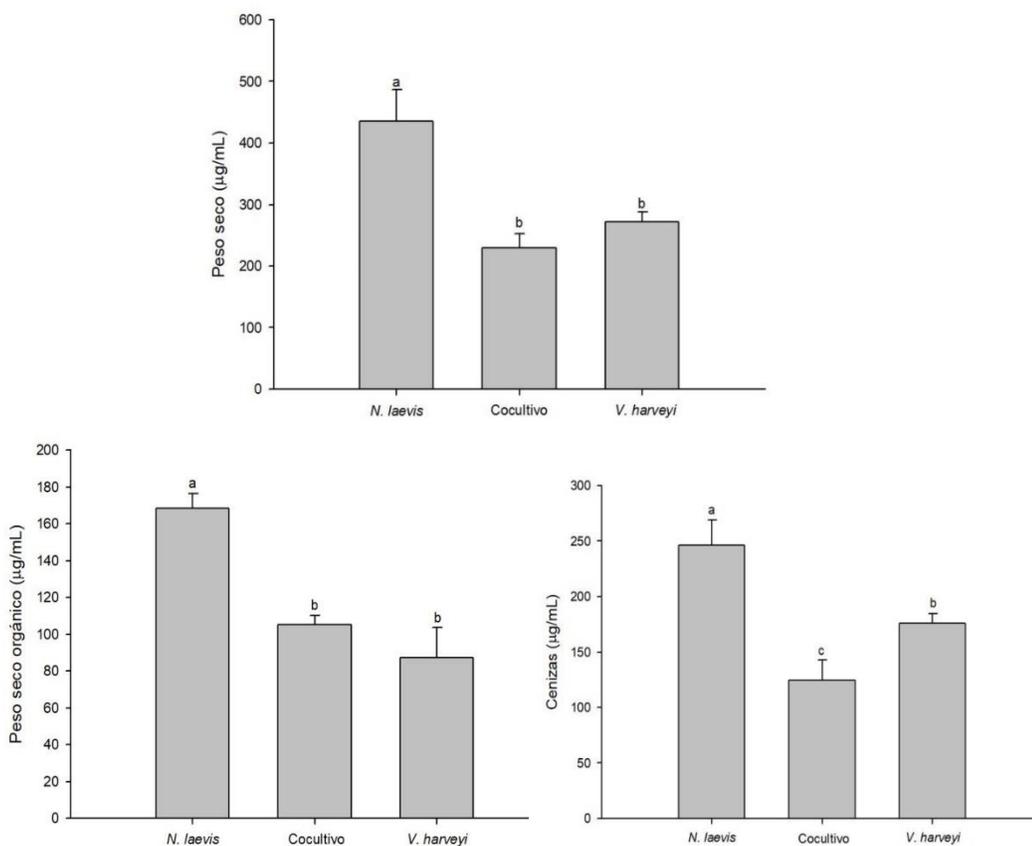
El valor máximo de la densidad celular de *N. laevis* en cocultivo con *V. harveyi* fue alcanzado a las 168 h y fue de  $9.45 \pm 0.40 \times 10^5$  células/mL. Las bacterias heterótrofas llegaron a  $36.10 \pm 2.10 \times 10^6$  UFC/mL en el último día del experimento (Figura 31). Tanto el tratamiento control de *V. harveyi* como el de cocultivo se reportan por conteos realizados en los sembrados en caja Petri con medio TCBS. El control de *V. harveyi* se mantuvo en niveles superiores a  $1 \times 10^4$  (UFC/mL), llegando a una concentración máxima de  $2.39 \pm 0.23 \times 10^5$  UFC/mL a las 48 h. Al finalizar el experimento (168 h) la concentración de *V. harveyi*/mL en el tratamiento control fue de  $5.1 \pm 0.11 \times 10^4$  UFC/mL, lo cual es superior a lo esperado ( $1 \times 10^4$  UFC/mL). A las 96 h se reportaron niveles indetectables de *V. harveyi* en el cocultivo y esta condición se mantuvo hasta las 168 h, por lo que la diatomea *N. laevis* logró inhibir completamente a *V. harveyi*.



**Figura 31.** Reto de inhibición en cocultivo de *N. laevis* contra *V. harveyi*. *N. laevis* (●), *V. harveyi* (□), *V. harveyi* en medio "f" (■) y bacterias heterotróficas (▲). Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $n=3$ .

### 3.2.5.3 Peso seco total, contenido de cenizas y peso seco orgánico de *N. laevis*

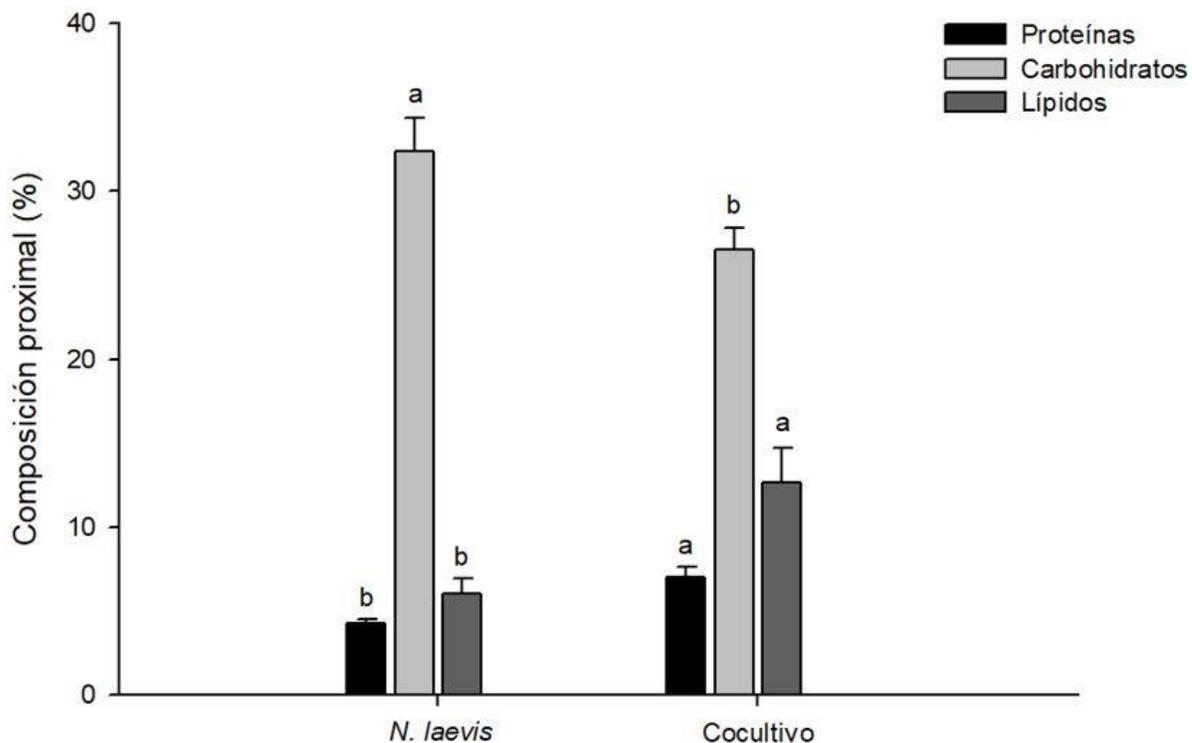
El peso seco total presentó diferencias significativas entre el cultivo de *N. laevis*, el cocultivo y *V. harveyi*. ( $p < 0.05$ ). La adición de *V. harveyi* disminuyó el peso seco total del cocultivo en comparación al tratamiento control de *N. laevis*. El mayor peso seco total se obtuvo en el monocultivo con *N. laevis* (435.33  $\mu\text{g/mL}$ ). El peso seco orgánico (PSO) presentó diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). La adición de *V. harveyi* disminuyó el peso seco orgánico, comparado con el tratamiento control de *N. laevis*. El mayor peso seco orgánico se observó en el cultivo con *N. laevis* con un valor de 168.55  $\mu\text{g/mL}$ . Para las cenizas, se observaron diferencias significativas entre todos los tratamientos ( $p < 0.05$ ). El mayor valor de cenizas se presentó en el cultivo con *N. laevis* (246.44  $\mu\text{g/mL}$ ), seguido del tratamiento con *V. harveyi* (176  $\mu\text{g/mL}$ ) y el menor valor se presentó en el cocultivo (124.33  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 32).



**Figura 32.** Valores de peso seco total, peso seco orgánico y cenizas para *N. laevis*, cocultivo y *V. harveyi*. ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $n=3$ .

### 3.2.5.4 Composición proximal de *N. laevis* en cocultivo con *V. harveyi* (DN01/CICESE 597)

Se obtuvo un significativamente mayor contenido de proteínas ( $p<0.05$ ) y lípidos ( $p<0.05$ ) en el cocultivo, mientras que en el cultivo de *N. laevis* el porcentaje de carbohidratos fue significativamente mayor ( $p<0.05$ ) (Figura 33).



**Figura 33.** Composición proximal de *N. laevis* y cocultivo. ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey  $\alpha=0.05$ ).  $n=3$ .

### 3.2.5.5 Composición de ácidos grasos de *N. laevis*

En la mayoría de los valores totales de ácidos grasos para *N. laevis* y el cocultivo se presentan valores similares (Tabla 10).

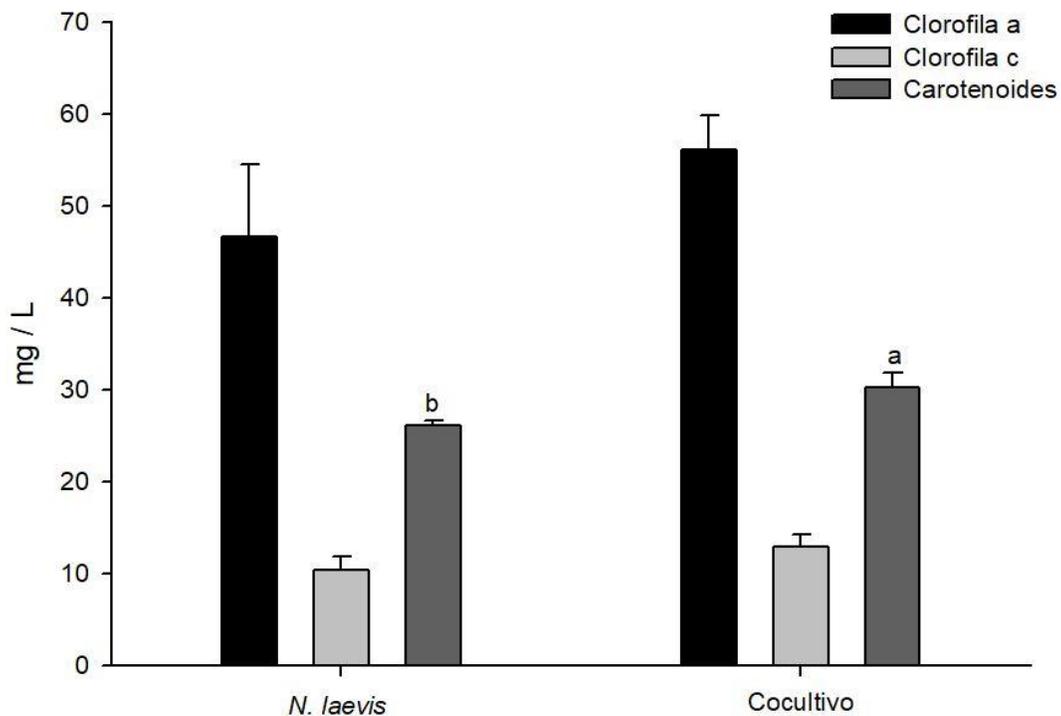
**Tabla 10.** Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de ácidos grasos de *N. laevis* en presencia o ausencia de *V. harveyi* y valores de *V. harveyi* en cultivo control (n=1).

Composición de ácidos grasos	<i>N. laevis</i>	<i>N. laevis</i> + <i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>
<b>SFA</b>			
<b>C4:0</b>	0.53 ± 0.23 a	0.24 ± 0.16 a	4.25
<b>C10:0</b>	4.92 ± 1.08 a	3.52 ± 1.60 a	6.78
<b>C11:0</b>	0.03 ± 0.00 a	0.02 ± 0.01 a	0.10
<b>C12:0</b>	0.04 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.42
<b>C13:0</b>	2.50 ± 1.96 a	2.15 ± 1.14 a	1.88
<b>C14:0</b>	7.29 ± 0.18 a	7.80 ± 0.21 a	3.38
<b>C15:0</b>	0.51 ± 0.00 a	0.49 ± 0.04 a	0.59
<b>C16:0</b>	10.86 ± 0.78 a	11.47 ± 0.66 a	19.25
<b>C17:0</b>	4.51 ± 0.39 a	4.70 ± 0.06 a	1.37
<b>C18:0</b>	1.64 ± 0.39 a	1.71 ± 0.39 a	13.09
<b>C20:0</b>	ND	ND	1.66
<b>C21:0</b>	2.91 ± 0.15 a	2.53 ± 0.21 a	2.20
<b>C22:0</b>	ND	ND	0.38
<b>C23:0</b>	0.22 ± 0.06 a	0.12 ± 0.04 a	ND
<b>C24:0</b>	0.63 ± 0.04 a	0.63 ± 0.02 a	0.92
<b>USFA</b>			
<b>C22:2</b>	0.10 ± 0.02 a	0.09 ± 0.02 a	ND
<b>MUFA</b>			
<b>C14:1n-5</b>	0.04 ± 0.02 a	0.07 ± 0.02 a	0.41
<b>C15:1</b>	0.06 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 a	ND
<b>C16:1n-7</b>	33.52 ± 0.76 a	35.03 ± 1.63 a	6.86
<b>C17:1</b>	ND	ND	0.54
<b>C18:1n-9 C</b>	1.18 ± 0.17 a	1.35 ± 0.60 a	25.70
<b>C18:1n-9 T</b>	1.30 ± 0.08 a	1.36 ± 0.01 a	1.86
<b>C22:1n-9</b>	ND	ND	1.63
<b>C24:1n-9</b>	ND	ND	0.12
<b>PUFA</b>			
<b>C18:2n-6 C</b>	0.23 ± 0.04 a	0.22 ± 0.05 a	0.35
<b>C18:2n-6 T</b>	1.67 ± 0.23 a	1.39 ± 0.05 a	ND
<b>C18:3n-6</b>	0.59 ± 0.10 a	0.65 ± 0.08 a	1.46
<b>C18:3n-3</b>	ND	ND	0.94
<b>C20:2n-6</b>	0.31 ± 0.03 a	0.28 ± 0.04 a	0.05
<b>C20:3n-6</b>	9.00 ± 1.11 a	9.66 ± 0.58 a	0.41
<b>C20:4n-6</b>	2.40 ± 0.13 a	2.09 ± 0.17 a	1.82
<b>C20:5n-3</b>	11.75 ± 0.50 a	11.09 ± 1.26 a	1.03
<b>C22:6n-3</b>	1.25 ± 0.09 a	1.22 ± 0.06 a	0.54
<b>Total</b>			
<b>ΣSFA</b>	<b>36.58 %</b>	<b>35.43 %</b>	<b>56.28 %</b>
<b>ΣUSFA</b>	<b>0.10 %</b>	<b>0.09 %</b>	<b>ND</b>
<b>ΣMUFA</b>	<b>36.10 %</b>	<b>37.88 %</b>	<b>37.12 %</b>
<b>ΣPUFA</b>	<b>27.22 %</b>	<b>26.60 %</b>	<b>6.60 %</b>

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

### 3.2.5.6 Cuantificación de pigmentos de *N. laevis*

Para la clorofila a (Chl-a) y clorofila c (Chl-c) no se presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre el cultivo monoespecífico de *N. laevis* y el cocultivo, mientras que para el contenido de carotenoides si se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el cocultivo y *N. laevis*, obteniendo una mayor concentración para el cocultivo (Figura 34).



**Figura 34.** Valores promedio y desviación estándar del contenido de clorofila a (Chl-a), clorofila c (Chl-c) y carotenoides (car) de *N. laevis* en presencia o ausencia de *V. harveyi* al finalizar el reto de inhibición. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para cada grupo de pigmentos. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos:  $a > b$ .  $n=3$ .

## Capítulo 4. Discusión

---

### 4.1 Experimentación final

#### 4.1.1 Crecimiento de *N. incerta* y *N. laevis* en cocultivo con *V. alginolyticus* (ATCC17749/CAIM 516) y *V. harveyi* (DN01/CICESE 597)

Para el reto de inhibición de *N. incerta* con *V. alginolyticus*, no se presentaron diferencias significativas entre la tasa de crecimiento de la diatomea *N. incerta*,  $0.33 \pm 0.02$  divisiones/día y el cocultivo (*N. incerta* y *V. alginolyticus*),  $0.34 \pm 0.02$  divisiones/día. Las tasas de crecimiento fueron mayores a las obtenidas por Molina-Cárdenas (2011), en cultivo monoespecífico ( $0.191 \pm 0.03$  y  $0.199 \pm 0.014$ , cultivadas a 28 °C y 20 °C respectivamente) utilizando la misma especie de diatomea, con un nivel de irradiancia mayor ( $110 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) y el medio de cultivo "E". Las mayores tasas de crecimiento obtenidas en esta investigación para *N. incerta*, pueden ser debidas a la composición del medio "f", el cual resultó más apropiado por la menor concentración de nutrientes respecto al medio "E". Además, la temperatura utilizada en este estudio para los cultivos de *N. incerta* tuvo un promedio de 25 °C, lo cual coincide con lo descrito por Chávez-Medrano (2008), quien menciona que la temperatura óptima para el cultivo de *N. incerta* es de 20 °C a 25 °C, ya que en este rango no se observan importantes cambios en su composición proximal y en la fotosíntesis. Este último autor menciona valores de tasas de crecimiento de  $0.41 \pm 0.10$  divisiones/día y  $0.43 \pm 0.01$  divisiones/día al tercer y cuarto día de cultivo, utilizando los mismos valores de irradiancia y medio de cultivo, pero con temperatura similar.

Para *N. incerta* con *V. harveyi*, el cultivo monoespecífico de *N. incerta* presentó una tasa de crecimiento mayor ( $0.41 \pm 0.04$  divisiones/día) que la obtenida para el cocultivo ( $0.34 \pm 0.03$  divisiones/día), lo cual indica que la adición de *V. harveyi* disminuyó el crecimiento en comparación con el cultivo de *N. incerta*. La tasa de generación obtenida en el cocultivo fue menor a lo evaluado por Ayala-García (2021),  $0.42 \pm 0.04$  divisiones/día con la especie *N. subinflatoides* en cocultivo con *V. harveyi* y bajo condiciones ambientales similares que las utilizadas en esta investigación.

Para la diatomea *N. laevis* y *V. alginolyticus*, la diatomea en cocultivo presentó un mayor crecimiento que el monocultivo a las 48, 96, 120, 144 y 168 h, presentando diferencias significativas, lo cual nos indica que

la adición de *V. alginolyticus* estimuló el crecimiento de la diatomea. También se observaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento, obteniendo  $0.55 \pm 0.01$  divisiones/día para el cocultivo y  $0.46 \pm$  divisiones/día para el cultivo de *N. laevis*. La tasa de crecimiento de *N. laevis* en monocultivo fue superior a lo obtenido por Molina-Cárdenas (2011),  $0.27 \pm 0.01$  divisiones/día, con la misma cepa, pero utilizando el medio "E" y tratando de simular las condiciones de una granja de camarón en cuanto a nutrientes. Como se describió anteriormente, las variaciones en las tasas de crecimiento se pueden atribuir al medio con el cual fueron cultivadas las diatomeas, siendo el medio "f" el más apropiado para su crecimiento.

En el caso de *N. laevis* y *V. harveyi*, se observó un crecimiento mayor en la diatomea ( $14.03 \pm 1.17 \times 10^5$  células/mL), comparado con el cocultivo ( $9.45 \pm 0.40 \times 10^5$  células/mL), al finalizar el experimento (168 h), por lo cual la adición de *V. harveyi* perjudicó el crecimiento de la diatomea.

Si bien no existe un patrón específico en las tasas de crecimiento observadas, se infiere que este crecimiento es especie específico. En los casos en los que el crecimiento de las especies de diatomeas se vio perjudicado por la adición de *Vibrio*, esto se puede deber a que los exudados o residuos metabólicos de las diatomeas sirvieron como nutrientes para el crecimiento de *Vibrio* y por ende compitieron por espacio, limitando el crecimiento de las diatomeas.

#### 4.1.2 Efecto inhibitorio

##### *N. incerta*

El presente estudio demostró que *N. incerta* es capaz de inhibir el crecimiento de *V. alginolyticus* inoculado a una concentración superior a  $10^5$  UFC *V. alginolyticus*/mL la cual se mantuvo durante todo el reto (192 h) en el tratamiento control y se vio inhibida en el cocultivo. Lo antes descrito corrobora lo encontrado por Molina-Cárdenas y Sánchez-Saavedra (2017), donde se logró la inhibición de *V. alginolyticus* al cuarto día y a una concentración de  $1 \times 10^3$  UFC *V. alginolyticus*/mL (la concentración fue inferida pero no comprobada). Si bien en el presente estudio, no se logró la inhibición total, probablemente fue debido a la alta densidad de UFC de *Vibrio* con la que se inició el reto, sin embargo, se lograron niveles menores a  $3.33 \times 10^3$  *V. alginolyticus*/mL a las 192 h. Comparando estos resultados con lo obtenido por Ayala-García (2021), el cual obtuvo una inhibición a las 48 h utilizando la diatomea *N. subinflatoides*, no obstante, los cocultivos fueron inoculados con una concentración menor,  $1 \times 10^2$  UFC *V. alginolyticus*/mL, la cual fue inferida mas

no comprobada, por lo cual representó 3 órdenes de magnitud inferiores a lo reportado en este trabajo de investigación con *N. incerta*.

En este estudio, *N. incerta* logró la inhibición total de *V. harveyi* a las 48 h post inoculación. Este reto se inició a una concentración de  $1 \times 10^4$  UFC *V. harveyi*/mL y esta concentración se mantuvo en el tratamiento control hasta el final del experimento. Este resultado fue más eficaz en cuanto al tiempo de inhibición que el obtenido por Molina-Cárdenas y Sánchez-Saavedra (2017), donde lograron la inhibición a las 96 h y con una concentración de *Vibrio* en un orden de magnitud menor ( $1 \times 10^3$  UFC *V. harveyi*/mL). Ayala-García (2021), reporta la inhibición de *V. harveyi* a las 48 h con *N. subinflatooides*, sin embargo, el orden de magnitud con el que fue iniciado el reto ( $1 \times 10^2$  UFC *V. harveyi*/mL), el cual el autor infiere, pero no comprobó la densidad inicial y que fue menor al utilizado en el presente estudio con *N. incerta* y *V. harveyi* ( $1 \times 10^5$  UFC *V. harveyi*/mL).

Si bien ya se había reportado el efecto inhibitorio de *N. incerta* contra especies patógenas del género *Vibrio*, no se había logrado inhibir una concentración tan alta de bacterias, por lo cual este método de control biológico representa una tecnología prometedora para poder controlar vibriosis.

### ***N. laevis***

En el reto con *N. laevis* se logró inhibición contra *V. alginolyticus*, la cual se mantuvo en niveles superiores a  $1 \times 10^5$  UFC/mL en el tratamiento control, lo cual representa una concentración mucho mayor a lo esperado ( $1 \times 10^4$  UFC/mL). A pesar de que la densidad de *V. alginolyticus* fue un orden de magnitud mayor, se logró llegar a niveles menores a 10 *V. alginolyticus*/mL a partir de las 96 h en el cocultivo. Si bien no se logró llegar a la inhibición total de *V. alginolyticus*, este reto representó un efecto inhibitorio de gran relevancia por parte de *N. laevis* considerando que la concentración al inicio del experimento fue de  $4.3 \times 10^5$  UFC/mL. Los resultados obtenidos en este trabajo, se asemejan a lo reportado por Molina-Cárdenas y Sánchez-Saavedra (2017), quienes utilizaron la misma especie de diatomea y tuvieron inhibición un día antes (48 h). Sin embargo, estos autores utilizan para el reto de inhibición una concentración de *Vibrio* mucho menor ( $1 \times 10^3$  UFC/mL). Cabe destacar que en el presente trabajo se muestran los datos de los conteos por sembrados en caja TCBS, mientras que en el trabajo de Molina-Cárdenas y Sánchez-Saavedra (2017), se reportaron los resultados únicamente de los filtrados, por lo cual no se puede saber con certeza cual fue la concentración inicial de *Vibrio* en este último trabajo citado.

Existen otros métodos para el control de *V. alginolyticus* y *V. harveyi*, como la aplicación de vacunas, sin embargo, económicamente son muy costosas para el productor acuícola. La utilización de diatomeas como agente de biocontrol, puede resultar en un tratamiento económico y eficaz para controlar los brotes de vibriosis en los cultivos de peces. El hecho de que ambas especies de diatomeas (*N. incerta* y *N. laevis*) fueron aisladas de Baja California, los cultivos de peces que están desarrollándose en las instituciones científicas y privadas del estado pueden beneficiarse ya que, con lo reportado en este estudio, pueden ser candidatas potenciales para el control de la vibriosis, por el hecho de que se encuentran adaptadas a las condiciones fisicoquímicas del ambiente y esto ayudaría a controlar casos de vibriosis en granjas piscícolas del estado

Según lo reportado por Kokou *et al.* (2012), los principales compuestos con actividad antibacteriana producidos por microalgas son los ácidos grasos, terpenoides, carbohidratos, péptidos, polisacáridos y alcaloides. Si bien por la técnica empleada en este estudio (cocultivo), no se puede saber con certeza cuál de los grupos anteriores es el que presenta la actividad contra las especies de *Vibrio* estudiadas, para *N. incerta* se han reportado polisacáridos sulfatados como el compuesto Naviculan, el cual presenta actividad antimicrobiana y antiviral (Lee *et al.*, 2006). También se han reportado pigmentos, tales como ficobiliproteínas obtenidas de especies de microalgas y cianobacterias (Najdensk *et al.*, 2013), pero en la mayoría de los estudios, los compuestos con actividad antibacteriana son ácidos grasos.

#### 4.1.3 Peso seco

##### ***N. incerta***

En el reto con *N. incerta* el peso seco total, peso seco orgánico y contenido de cenizas no se modificó por la adición *V. alginolyticus*, lo cual difiere con lo encontrado por Ayala-García (2021), ya que al utilizar la diatomea *N. subinflatooides* en un reto de inhibición con *V. alginolyticus*, el peso seco total disminuyó por la adición de *V. alginolyticus*. Esta diferencia puede atribuirse al orden de magnitud de *V. alginolyticus* con el cual se inició el reto con *N. incerta*, ya que en este caso se inició con  $1 \times 10^5$  UFC *V. alginolyticus*/mL, mientras que en el estudio realizado por Ayala-García (2021) se inició con  $1 \times 10^2$  UFC *V. alginolyticus*/mL.

Sin embargo, para el reto de inhibición de *N. incerta* con *V. harveyi* se encontró que disminuyó el peso seco total, peso seco orgánico y contenido de cenizas por la adición *V. harveyi*. Lo anterior, se puede

atribuir a que se logró la inhibición de *V. harveyi* a las 48 h y al no haber bacterias patógenas disminuyó la tasa de crecimiento de esta especie de *N. incerta*.

### ***N. laevis***

Para el reto de *N. laevis* y *V. alginolyticus* el peso seco total, peso seco orgánico y contenido de cenizas incrementaron por la adición de *V. alginolyticus*. Este incremento en los pesos puede ser debido al orden de magnitud ( $1 \times 10^5$  UFC *V. alginolyticus*/mL) con el cual fue iniciado el cocultivo de *N. laevis* y *V. alginolyticus*, ya que en este caso se estimuló el crecimiento por la adición de *V. alginolyticus*.

Para el reto de *N. laevis* con *V. harveyi* se observó una disminución en los valores del peso seco total, peso seco orgánico y contenido de cenizas por la adición de *V. harveyi*. Esta tendencia se puede atribuir a que la concentración inicial de *V. harveyi* en el cocultivo con *N. laevis* fue de  $1 \times 10^4$  UFC *V. harveyi*/mL. Posiblemente, debido a la baja concentración de *V. harveyi* al inicio del reto, no se logró un efecto promotor del crecimiento de *N. laevis*, respecto a lo obtenido en el cultivo con *V. alginolyticus*.

El “quorum sensing” (QS) es el método de comunicación entre bacterias, esta se basa en la biosíntesis y excreción de pequeñas moléculas llamadas autoinductores las cuales permiten sincronizar la densidad de la población celular y regular la expresión génica, permitiendo a las células responder a los cambios en el entorno. Se ha reportado que algunas diatomeas tienen la capacidad de interrumpir el “quorum sensing” de bacterias patógenas cuando se ven amenazadas (Amin et al., 2012). Por lo anterior, este mecanismo de disrupción del “quorum sensing” pudo haberse presentado en los retos de inhibición provocando la disminución de las bacterias del género *Vibrio*.

#### **4.1.4 Composición proximal**

##### ***N. incerta* y *N. laevis***

Para el reto de inhibición de *N. incerta* con *V. alginolyticus* se observó un incremento en el contenido de proteínas para el cocultivo de *N. incerta* con *V. alginolyticus* con respecto al cultivo monoespecífico de *N. incerta*. La tendencia antes descrita, difiere con lo obtenido por Ayala-García (2021) quien reporta una disminución del contenido de proteínas para el cocultivo de *N. subinflatooides* y *V. alginolyticus*. Esto puede

atribuirse a que en el presente trabajo se encontró un incremento el contenido de carbohidratos (23%) y que estos pudiesen causar un efecto inhibitorio de *V. alginolyticus* y *V. harveyi*.

Para el reto de inhibición de *N. laevis* con *V. alginolyticus* se observó un mayor contenido de carbohidratos y un menor contenido de proteínas para el cocultivo. Lo anterior puede atribuirse a que el efecto inhibitorio contra *V. alginolyticus* proviene de la actividad de los carbohidratos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio con *N. incerta* y *N. laevis* y el efecto inhibitorio para *V. alginolyticus* y *V. harveyi*, son atribuidos al contenido de carbohidratos. Se encontró que en *Arthospira maxima* se producen polisacáridos sulfatados con actividad antitumoral y antioxidante (Raposo *et al.*, 2013). En el trabajo realizado por Hafsa *et al.* (2017), reportan actividad antimicrobiana de extractos de polisacáridos solubles en agua para las microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oculata* contra bacterias Gram-positivas (G+) y Gram-negativas (G-).

Para los retos de inhibición de *N. incerta* con *V. alginolyticus* y *V. harveyi* se encontraron valores de proteínas mayores en el cocultivo de *N. incerta* y *V. alginolyticus* (11.69%) y también para el cocultivo de *N. incerta* y *V. harveyi* (8.29%), respecto a lo obtenido en el monocultivo (6.47% a 8.99%). Para los retos de inhibición de *N. incerta* con *V. alginolyticus* y *V. harveyi* no se presentaron diferencias significativas en el contenido de lípidos por la adición de *V. alginolyticus* y *V. harveyi*.

En trabajos previos con *N. incerta* se encontró que la composición proximal fue en promedio de 12.84% para proteínas y de 6.46% para lípidos (Correa-Reyes *et al.*, 2009). Los valores de proteínas evaluados para *N. incerta* en monocultivo y en cocultivo con *V. alginolyticus* y *V. harveyi* fueron menores que los reportados por Correa Reyes *et al.* (2009). Sin embargo, los valores de lípidos evaluados en esta investigación en las distintas condiciones experimentales en los retos con *N. incerta*, se encontraron valores de lípidos similares a los descritos por Correa Reyes *et al.* (2009). Las diferencias en los valores antes descritos para la composición proximal obtenidos en esta investigación pueden atribuirse a que en el trabajo de Correa Reyes *et al.* (2009) utilizaron una irradiancia de 150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  y que correspondió a un 50% de mayor irradiancia y a que los cultivos se realizaron a un mayor volumen (cubetas plásticas de 20 L), lo anterior promovió una mayor síntesis en el contenido de proteínas.

En trabajos previos con *N. laevis* se encontró que la composición proximal fue en promedio de 11.48% para proteínas y 8.99% para lípidos (Correa-Reyes *et al.*, 2009). Los valores de proteínas evaluados para *N. laevis* en cocultivo con *V. alginolyticus* fueron similares a los reportados por Correa-Reyes *et al.* (2009). En

los retos realizados con *N. laevis* y *V. harveyi*, se encontró que en las distintas condiciones experimentales los valores de proteínas fueron menores a los descritos por Correa Reyes *et al.* (2009). Sin embargo, los valores de lípidos evaluados en esta investigación en las distintas condiciones experimentales en los retos con *N. laevis*, se encontraron valores de lípidos similares a los descritos por Correa Reyes *et al.* (2009). Estas diferencias pueden ser debidas a las distintas condiciones experimentales utilizadas por los autores antes descritos para el mantenimiento de los cultivos de *N. laevis*.

#### 4.1.5 Pigmentos

Para los retos de inhibición de *N. incerta* y *N. laevis* contra *V. alginolyticus* y *V. harveyi* se observó un alto contenido de clorofila a para los cocultivos. Esto pudiese atribuirse a que este pigmento producido por *N. incerta* y *N. laevis* pudiese tener actividad antivibrio contra *V. alginolyticus* y *V. harveyi*. Se ha demostrado que ciertos pigmentos poseen actividad antibacteriana. Falaise *et al.* (2019) reportan que el pigmento azul marenina, producido por la diatomea marina *Haslea ostrearia*, se acumula en los ápices de las células antes de ser expulsado al medio ambiente. En estudios con marenina se ha evaluado actividad antibacteriana, en experimentos *in vitro*, contra las bacterias patógenas *V. anguillarum*, *V. aestuarianus* y *V. splendidus*.

En el trabajo realizado por Ahmadi *et al.* (2022) evaluaron las propiedades antibacterianas de clorofilas extraídas de alfalfa (*Medicago sativa*), reportando una gran actividad antibacteriana de la clorofila a contra las bacterias *Listeria* sp. y *Staphylococcus* sp.

Se ha descrito actividad antibacteriana en diversas especies de macroalgas marinas, contra bacterias Gram positivas (G+) y Gram negativas (G-) por acción de los carotenoides, principalmente la fucoxantina (Gomes *et al.*, 2022). Además, se ha reportado que en diatomeas marinas y macroalgas pardas se produce fucoxantina en altas concentraciones (Karpiński y Adamczak, 2019). Por lo anterior, es posible que el incremento de los carotenoides en el cocultivo de *N. laevis* y *V. alginolyticus*, así como en *N. laevis* y *V. harveyi*, pudiesen causar acción antibacteriana.

Debido a la metodología utilizada en este estudio (cocultivo), no es posible elucidar o definir qué tipo de compuesto o compuestos son los que produjeron *N. incerta* y *N. laevis*, por lo que sería necesario realizar extractos para poder identificar el compuesto o los compuestos que poseen este efecto inhibitorio contra *V. alginolyticus* y *V. harveyi*.

#### 4.1.6 Composición de ácidos grasos

Los ácidos grasos se liberan cuando la célula de la microalga pierde su integridad y estos compuestos están involucrados en un mecanismo de defensa para proteger a la población de microalgas contra otros organismos, como son las bacterias patógenas. Es probable que las membranas celulares de las bacterias son el sitio sobre el cual actúan los ácidos grasos, o bien, inhibiendo la síntesis de ácidos grasos en las bacterias (Falaise *et al.*, 2016). Se ha reportado que la diatomea *N. delognei* produce compuestos antibacterianos, dentro de los que destacan los ácidos grasos hexadecatetraenoico y octadecatrienoico (ambos ácidos grasos poliinsaturados) y el éster (E)-phytol. Estos compuestos presentaron actividad antibacteriana contra las bacterias patógenas, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus vulgaris* y *Salmonella enterica serovar* (Amin *et al.*, 2012). En otros estudios se ha encontrado que el ácido graso hexadecatreinoico (HTA) es tóxico para *V. anguillarum* (Findlay y Patil, 1984).

Por anterior, la actividad contra *Vibrio* reportada en este estudio para las dos especies de diatomeas, *N. incerta* y *N. laevis*, puede atribuirse a la producción de ácidos grasos poliinsaturados que actúan contra *V. alginolyticus* y *V. harveyi*. Dentro de los compuestos de defensa de las diatomeas se encuentran los ácidos grasos y ésteres, los cuales al ser hidrofóbicos pueden cruzar las membranas celulares de las bacterias sin la necesidad de receptores.

Para corroborar esta hipótesis, sería necesario preparar extractos de los cultivos de *N. incerta* y *N. laevis* para identificar los metabolitos secundarios que presenten esta bioactividad contra *V. alginolyticus* y *V. harveyi*.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

La tasa de crecimiento de la diatomea *N. incerta* aumentó por la adición de *V. alginolyticus* y disminuyó cuando se mantuvo en cocultivo con *V. harveyi*.

Se logró la inhibición de *V. alginolyticus* por parte de *N. incerta* al mantenerse en cocultivo. A las 96 h los niveles detectados fueron de 30 *V. alginolyticus*/mL, mientras que a las 192 h fue menor a 4 *V. alginolyticus*/mL.

Se consiguió la inhibición de *V. harveyi* a las 48 h a niveles menores de 0.1 *V. harveyi*/mL por parte de *N. incerta* por medio de la técnica de cocultivo, y esta concentración se mantuvo hasta el final del reto (144 h). El tratamiento control de *V. harveyi* se mantuvo en valores superiores a  $1 \times 10^4$  UFC/mL durante todo el experimento. El contenido de bacterias heterotróficas alcanzó su valor máximo ( $70.9 \pm 14.28 \times 10^6$  UFC/mL) al final del experimento.

La tasa de crecimiento de *N. laevis* disminuyó por la adición de *V. alginolyticus* y *V. harveyi*.

Se obtuvo la inhibición de *V. alginolyticus* al mantenerla en cocultivo con *N. laevis*. Se lograron niveles inferiores a 0.1 *V. alginolyticus*/mL a las 96 h y durante los días posteriores se mantuvieron en valores menores a 15 *V. alginolyticus*/mL hasta las 168 h.

La inhibición total del crecimiento de *V. harveyi*, por parte de *N. laevis* en cocultivo, se observó a las 96 horas y esta se mantuvo hasta el final del experimento (168 h). El contenido de bacterias heterotróficas alcanzó su valor máximo ( $36.10 \pm 2.10 \times 10^6$  UFC/mL) al final del experimento.

Los retos de inhibición realizados con las dos especies de diatomeas (*N. incerta* y *N. laevis*) demuestran el gran potencial inhibitorio contra *V. alginolyticus* y *V. harveyi*.

Posiblemente los compuestos producidos por *N. incerta* y *N. laevis* sean carbohidratos o ácidos grasos que actúan a nivel de la membrana celular de *V. alginolyticus* y *V. harveyi*.

## Capítulo 6. Recomendaciones

---

Realizar estudios *in vivo* con larvas de peces, juveniles y de ser posible reproductores, para corroborar el efecto inhibitorio de las diatomeas *N. incerta* y *N. laevis* sobre *V. alginolyticus* y *V. harveyi*.

Realizar extractos de ambas especies de diatomeas (*N. incerta* y *N. laevis*) para poder identificar el o los compuestos que producen el efecto inhibitorio.

Determinar la concentración mínima de células de *N. incerta* y *N. laevis* que aun tengan el efecto inhibitorio demostrado en este estudio contra *V. alginolyticus* y *V. harveyi*.

Al tener la concentración mínima de células de *N. incerta* y *N. laevis* podría implementarse esta tecnología, para evaluar la inhibición del crecimiento de *V. alginolyticus* y *V. harveyi* y evitar que altas concentraciones de células de estas especies de diatomeas puedan causar un estado de hipoxia en los cultivos de peces a tratar durante la noche.

## Literatura citada

---

- Abu Nor, N., Zamri-Saad, M., Md Yasin, I. S., Salleh, A., Mustaffa-Kamal, F., Matori, M. F., Azmai, M. N. A. 2020. Efficacy of whole cell inactivated *Vibrio harveyi* vaccine against vibriosis in a marine red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus*) model. *Vaccines*, 8(4), 734. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040734>
- Ahmadi, A., Shahidi, S. A., Safari, R., Motamedzadegan, A., Ghorbani-HasanSaraei, A. 2022. Evaluation of stability and antibacterial properties of extracted chlorophyll from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Food and Chemical Toxicology*, 163, 112980. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112980>
- Amin, S. A., Parker, M. S., Armbrust, E. V. 2012. Interactions between diatoms and bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(3), 667-684. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00007-12>
- Ayala-García, J.C 2021 Efecto inhibitorio de dos especies de diatomeas contra *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Ensenada, Baja California, México. 127 pp. <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3596>
- Anguiano-Beltrán, C. 1996. Patogenicidad de *Vibrio alginolyticus* sobre larvas del mejillón europeo *Mytilus galloprovincialis* y larvas y poslarvas de abulón rojo *Haliotis rufescens*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 60 pp. <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/1951>
- Berger, C. 2020. La acuicultura y sus oportunidades para lograr el desarrollo sostenible en el Perú. *South Sustainability*, 1(1), e003. <https://doi.org/10.21142/SS-0101-2020-003>
- Chávez-Medrano, C.I. 2008. Efecto de distintas variables ambientales en la fisiología y composición bioquímica de *Navicula incerta*. Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Ensenada, Baja California, México. 129 pp. <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/1156>
- Correa-Reyes, J.G. 2001. Selección de especies de diatomeas bentónicas para el cultivo de abulón. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Ensenada, Baja California, México. 142 pp. <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/2984>
- Correa-Reyes, J. G., Sánchez-Saavedra, M.P., Viana, M. T., Flores-Acevedo, N. Vásquez-Peláez, C. 2009. Effect of eight benthic diatoms as feed on the growth of red abalone (*Haliotis rufescens*) postlarvae. *Journal of Applied Phycology*, 21(4), 387-393. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9381-x>
- Crosa, J. H., Actis, L. A., Tolmasky, M. E. 2006. The biology and pathogenicity of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. En: *The Biology of Vibrrios*. Thompson, F.L., Austin, B., Swings, J. (Eds). Wiley Online Library, 249-265. <https://doi.org/10.1128/9781555815714.ch18>
- Das, B. K., Pradhan, J., Pattnaik, P., Samantaray, B. R., Samal, S. K. 2005. Production of antibacterial from the freshwater alga *Euglena viridis* (Ehren). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(1), 45-50. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-1555-3>

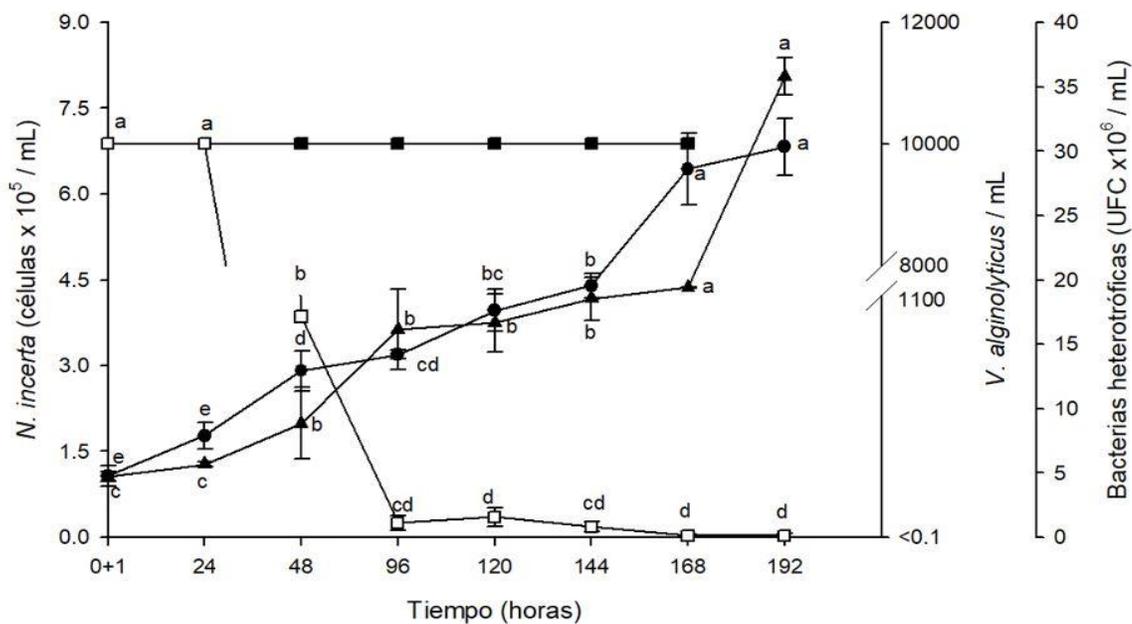
- Falaise, C., James, A., Travers, M. A., Zanella, M., Badawi, M., Mouget, J. L. 2019. Complex relationships between the blue pigment marennine and marine bacteria of the genus *Vibrio*. *Marine Drugs*, 17(3), 160. <https://doi.org/10.3390/md17030160>
- Falaise, C., François, C., Travers, M. A., Morga, B., Haure, J., Tremblay, R., Turcotte, F., Pasetto, P., Gastineau, R., Hardivillier, Y., Leignel, V., Mouget, J. L. 2016. Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. *Marine Drugs*, 14(9), 159. <https://doi.org/10.3390/md14090159>
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2022. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. Roma, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>
- Findlay, J. A., Patil, A. D. 1984. Antibacterial constituents of the diatom *Navicula delognei*. *Journal of Natural Products*, 47(5), 815-818. <https://doi.org/10.1021/np50035a010>
- Folch, J., Lee, M., Sloane-Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *The Journal of Biological Chemistry*, 22, 477-509. Recuperado el 1 de mayo de 2022 de: <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=58369b4acbd5c2652b6339d6&assetKey=AS%3A431855175507974%401479973705963>
- Fogg, G. E., Thake, B. 1987. *Algal cultures and phytoplankton ecology*. University of Wisconsin Press. Londres. 269 pp.
- Frans, I., Michiels, C. W., Bossier, P., Willems, K. A., Lievens, B., Rediers, H. 2011. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Diseases*, 34(9), 643-661. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01279.x>
- Gastineau, R., Hardivillier, Y., Leignel, V., Tekaya, N., Morançais, M., Fleurence, J., Mouget, J. L. 2012. Greening effect on oysters and biological activities of the blue pigments produced by the diatom *Haslea karadagensis* (Naviculaceae). *Aquaculture*, 368, 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.09.016>
- Guillard, R.L.L y J.H. Rhyter. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal Microbiology*, 8, 229-239. <https://doi.org/10.1139/m62-029>
- Gomes, L., Monteiro, P., Cotas, J., Gonçalves, A.M., Fernandes, C., Gonçalves, T., Pereira, L. 2022. Seaweeds' pigments and phenolic compounds with antimicrobial potential. *Biomolecular Concepts*, 13(1), 89-102. <https://doi.org/10.1515/bmc-2022-0003>
- González-Davis, O., Ponce-Rivas, E., Sánchez-Saavedra, M. D. P., Muñoz-Márquez, M. E., Gerwick, W. H. 2012. Bioprospection of microalgae and cyanobacteria as biocontrol agents against *Vibrio campbellii* and their use in white shrimp *Litopenaeus vannamei* culture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 43(3), 387-399. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2012.00567.x>
- Hafsa, M. B., Ismail, M. B., Garrab, M., Aly, R., Gagnon, J., Naghmouchi, K. 2017. Antimicrobial, antioxidant, cytotoxic and anticholinesterase activities of water-soluble polysaccharides extracted from microalgae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 82(5), 509-522. <https://doi.org/10.2298/JSC161016036B>

- Jeffrey, S.W., Humphrey, G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemistry Physiology Pflanzen*. 167, 191-194. [https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(17\)30778-3](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30778-3)
- Ji, Q., Wang, S., Ma, J., Liu, Q. 2020. A review: progress in the development of fish *Vibrio* spp. vaccines. *Immunology Letters*, 226, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.07.002>
- Ina-Salwany, M.Y., Al-Saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F.A., Mohd-Aris, A., Amal, M.N.A., Kasai, H., Mino, S., Sawabe, T., Zamri-Saad, M. 2019. Vibriosis in fish: A review on disease development and prevention. *Journal of Aquatic Animal Health*, 31(1), 3-22. <https://doi.org/10.1002/aah.10045>
- Karpiński, T. M., Adamczak, A. 2019. Fucoxanthin—An antibacterial carotenoid. *Antioxidants*, 8(8), 239. <https://doi.org/10.3390/antiox8080239>
- Kokou, F., Makridis, P., Kentouri, M., Divanach, P. 2012. Antibacterial activity in microalgae cultures. *Aquaculture Research*, 43(10), 1520-1527. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02955.x>
- Le, T. S., Southgate, P. C., O'Connor, W., Vu, S. V., Kurtböke, D. İ. 2020. Application of bacteriophages to control *Vibrio alginolyticus* contamination in oyster (*Saccostrea glomerata*) larvae. *Antibiotics*, 9(7), 415. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070415>
- Lee, J.B., Hayashi, K., Hirata, M., Kuroda, E., Suzuki, E., Kubo, Y., Hayashi, T. 2006. Antiviral sulfated polysaccharide from *Navicula directa*, a diatom collected from deep-sea water in Toyama Bay. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 29, 2135–2139. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.2135>
- Letchumanan, V., Chan, K.G., Pusparajah, P., Saokaew, S., Duangjai, A. Goh, B. H., Ab Mutalib, N.S., Lee, L.H. 2016. Insights into bacteriophage application in controlling *Vibrio* species. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1114. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01114>
- Levine, I. A. 2018. Algae: a way of life and health. En: *Microalgae in health and disease prevention*. Academic Press. 1-10. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00001-3>
- Lio-Po, G. D., Leaño, E. M., Peñaranda, M. M. D., Villa-Franco, A. U., Sombito, C. D., Guanzon Jr, N. G. 2005. Anti-luminous *Vibrio* factors associated with the 'green water' grow-out culture of the tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 250(1-2), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.029>
- Lowry, O.H., Rosebrugh, H.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265-275.
- Malara, G., R. Charra. 1972a. Dosages des glucides particuliers de phytoplankton selon la méthode de Dubois. Université de Paris. Station Zoologique. Villefrenche-Sur-Mer. Notes de Travail, 6,12.
- Metcalf, L. D., Schmitz, A. A., Pelka, J. R. 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*, 38(3), 514–515. <https://doi.org/10.1021/ac60235a044>
- Mohamad, N., Amal, M. N. A., Yasin, I. S. M., Saad, M. Z., Nasruddin, N. S., Al-saari, N., Mino, S., Sawabe, T. 2019. Vibriosis in cultured marine fishes: a review. *Aquaculture*, 512, 734289. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734289>

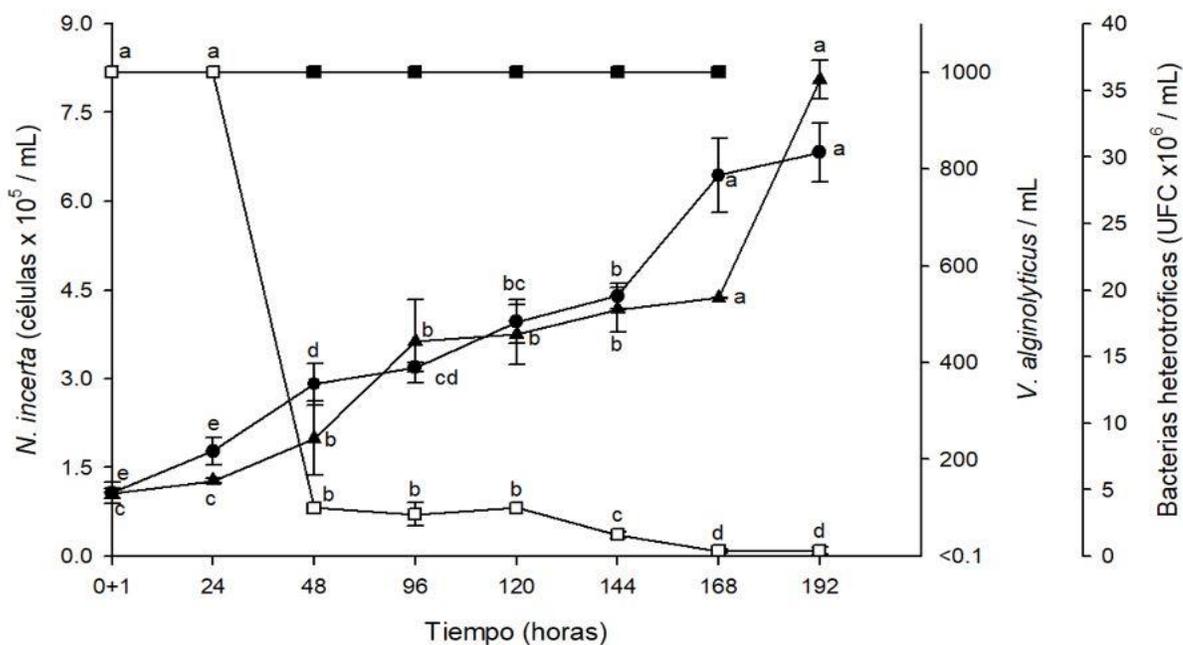
- Molina-Cárdenas, C.A. 2011. Efecto Inhibitorio de diferentes especies de microalgas sobre *Vibrio* spp. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Ensenada, Baja California, México. 96 pp. <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/112>
- Molina-Cárdenas, C. A., Sánchez-Saavedra, M. P. 2017. Inhibitory effect of benthic diatom species on three aquaculture pathogenic vibrios. *Algal Research*, 27, 131-139. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.004>
- Najdenski, H.M., Gigova, L.G., Iliev, I.I., Pilarski, P.S., Lukavský, J., Tsvetkova, I.V., Ninova, M.S., Kussovski, V.K. 2013. Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. *International Journal Food Science and Technology*, 48, 1533–1540. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12122>
- Oppenheimer, C. H., ZoBell, C. E. 1952. The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *Journal of Marine Research*, 11(1), 10-18. Recuperado el 1 septiembre de 2021 de: <https://images.peabody.yale.edu/publications/jmr/jmr11-01-02.pdf>
- Parsons, T.R., Maita, Y. Lalli, C.M. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Oxford, U.K. Pergamon Press. 101-106. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-07774-5>
- Pepi, M., & Focardi, S. (2021). Antibiotic-resistant bacteria in aquaculture and climate change: A challenge for health in the Mediterranean Area. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(11), 5723. <https://doi.org/10.3390/ijerph18115723>
- Pratt, R., Daniels, T. C., Eiler, J. J., Gunnison, J. B., Kumler, W. D., Oneto, J. F., Strain, H. H. 1944. Chlorellin, an antibacterial substance from *Chlorella*. *Science (Washington)*, 1944, 351-352. <https://doi.org/10.1126/science.99.2574.351>
- Preena, P. G., Swaminathan, T. R., Kumar, V. J. R., Singh, I. S. B. 2020. Antimicrobial resistance in aquaculture: a crisis for concern. *Biologia*, 75(9), 1497-1517. <https://doi.org/10.2478/s11756-020-00456-4>
- Ransangan, J., Mustafa, S. 2009. Identification of *Vibrio harveyi* isolated from diseased Asian seabass *Lates calcarifer* by use of 16S ribosomal DNA sequencing. *Journal of Aquatic Animal Health*, 21(3), 150-155. <https://doi.org/10.1577/H09-002.1>
- Raposo, M. F. d. J., De Morais, R. M. S. C., de Morais, A. M. M. B. 2013. Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae. *Marine Drugs*, 11(1), 233-252. <https://doi.org/10.3390/md11010233>
- Richards, G.P. 2014. Bacteriophage remediation of bacterial pathogens in aquaculture: a review of the technology. *Bacteriophage* 4: e975540. <https://doi.org/10.4161/21597081.2014.975540>
- Salvesen, I., Skjermo, J., Vadstein, O. 1999. Growth of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) during first feeding in relation to the proportion of r/K-strategists in the bacterial community of the rearing water. *Aquaculture*, 175(3-4), 337-350. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00110-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00110-6)
- Santiago, M. L., Espinosa, A., del Carmen Bermúdez, M. 2009. Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40(3), 22-32. Recuperado el 3 de enero de 2023 de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57912963005>

- Saracco-Álvarez, M.R. 2007. Compuestos con actividad antibacterial producidos por las microalgas *Nannochloropsis oculata* y *Porphyridium cruentum*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México. 54 pp. <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/1142>
- Schar, D., Klein, E. Y., Laxminarayan, R., Gilbert, M., Van Boeckel, T. P. 2020. Global trends in antimicrobial use in aquaculture. *Scientific Reports*, 10(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78849-3>
- Smith, S. A. 2019. *Fish diseases and medicine*. CRC Press. Boca Raton, EUA, 105-106.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. En: J. Stein (Ed.), *Handbook of Phycological Methods. Culture methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press. pp. 321-344.
- Stickney, R. R. 2000. *Encyclopedia of Aquaculture*. John Wiley & Sons. Nueva York, EUA. 1068 pp.
- Stickney, R. R., Gatlin III, D. M. 2022. *Aquaculture: An introductory text*. CABI. Boston, EUA. 349 pp.
- Tamura, K., Shimada, S., Prescott, L. M. 1971. Vibrio agar: a new plating medium for isolation of *Vibrio cholerae*. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 24(2), 125-127. <https://doi.org/10.7883/yoken1952.24.125>
- Tendencia, E. A., de la Peña, M. 2003. Investigation of some components of the green water system which makes it effective in the initial control of luminous bacteria. *Aquaculture*, 218(1-4), 115-119. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00524-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00524-0)
- Viso, A. C., Pesando, D., Baby, C. 1987. Antibacterial and antifungal properties of some marine diatoms in culture. *Botanica Marina*, 30, 41–46. <https://doi.org/10.1515/botm.1987.30.1.41>
- Yanong, R. P., Erlacher-Reid, C. 2012. Biosecurity in aquaculture, part 1: an overview. SRAC Publication, 4707, 522. Recuperado en septiembre de 2021 de: <https://fisheries.tamu.edu/files/2013/09/SRAC-Publication-No.-4707-Biosecurity-in-Aquaculture-Part-1-An-Overview.pdf>
- Yilmaz, S., Yilmaz, E., Dawood, M. A., Ringø, E., Ahmadifar, E., Abdel-Latif, H. M. 2022. Probiotics, prebiotics, and synbiotics used to control vibriosis in fish: A review. *Aquaculture*, 547, 737514. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737514>

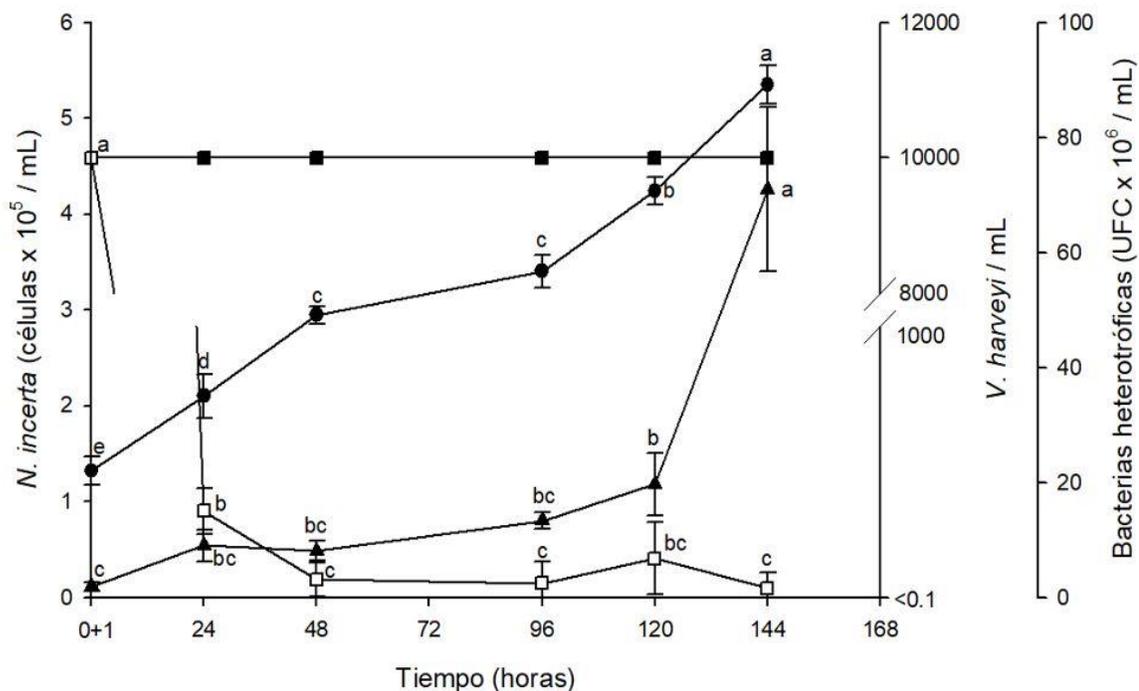
## Anexos



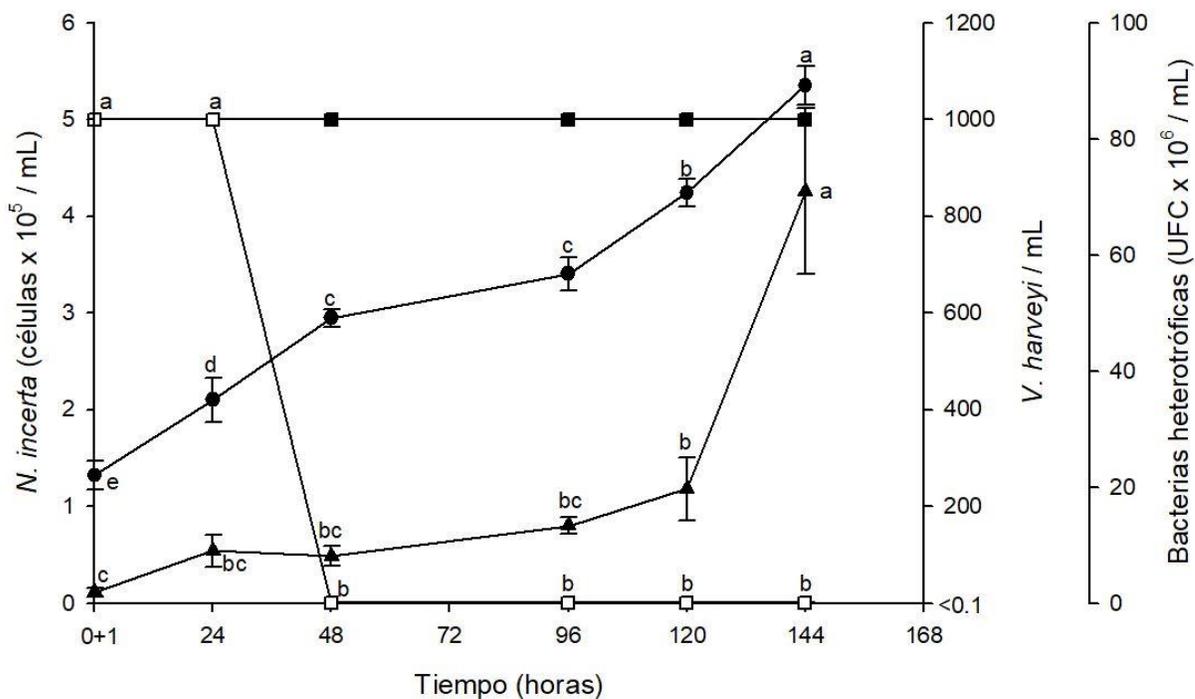
**Figura 35.** Reto de inhibición en cocultivo de *N. incerta* contra *V. alginolyticus*. *N. incerta* (●), *V. alginolyticus* (□), *V. alginolyticus* en medio "F" (■) y bacterias heterotróficas (▲). Filtrado de 1 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $n=3$ .



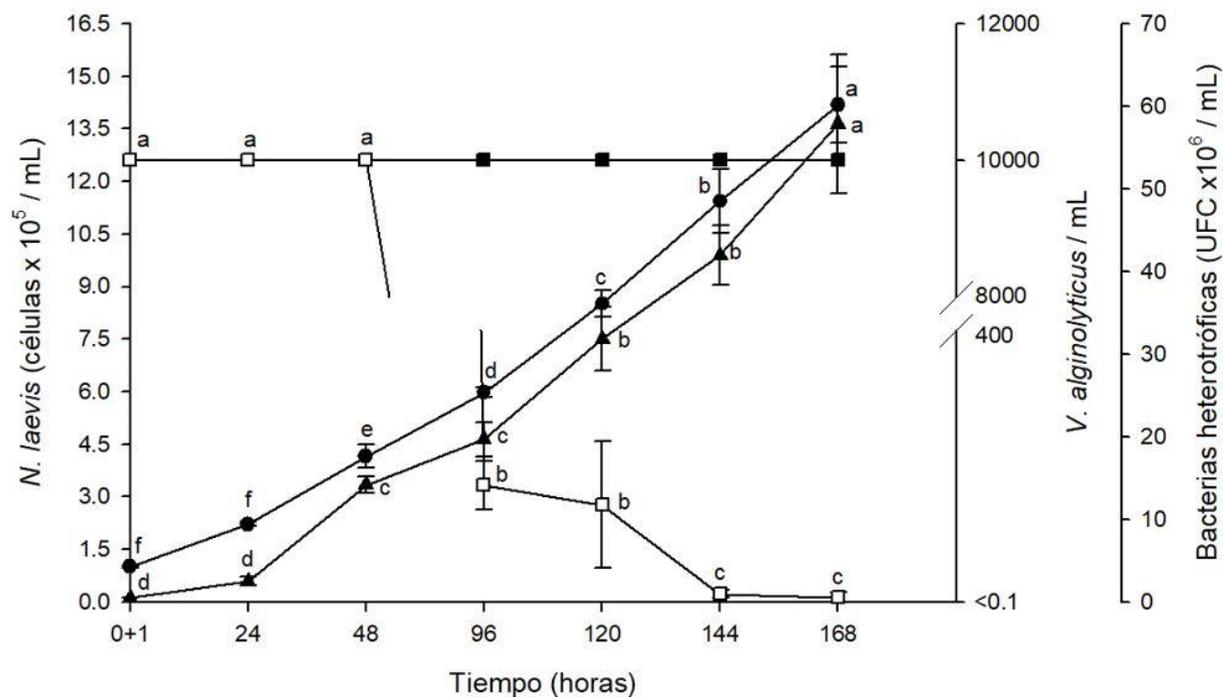
**Figura 36.** Reto de inhibición en cocultivo de *N. incerta* contra *V. alginolyticus*. *N. incerta* (●), *V. alginolyticus* (□), *V. alginolyticus* en medio "F" (■) y bacterias heterotróficas (▲). Filtrado de 10 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $n=3$ .



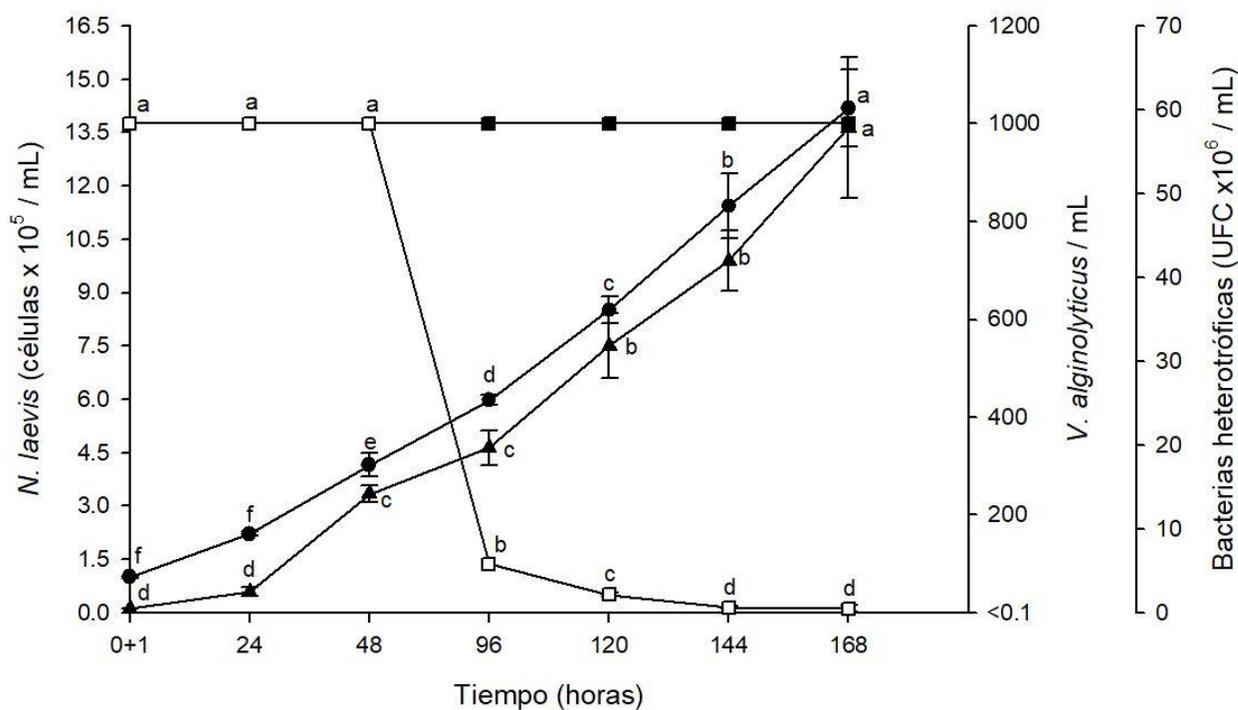
**Figura 37.** Reto de inhibición en cocultivo de *N. incerta* contra *V. harveyi*. *N. incerta* (●), *V. harveyi* (□), *V. harveyi* en medio "F" (■) y bacterias heterotróficas (▲). Filtrado de 1 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $n=3$ .



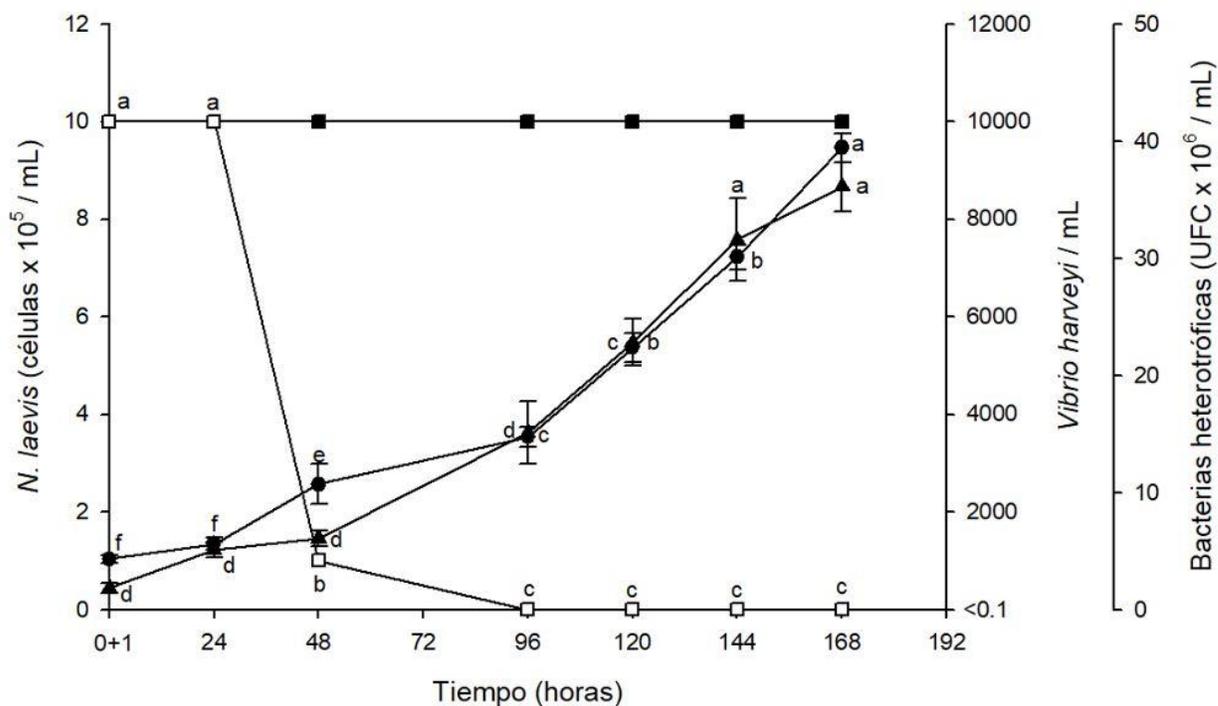
**Figura 38.** Reto de inhibición en cocultivo de *N. incerta* contra *V. harveyi*. *N. incerta* (●), *V. harveyi* (□), *V. harveyi* en medio "F" (■) y bacterias heterotróficas (▲). Filtrado de 10 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $n=3$ .



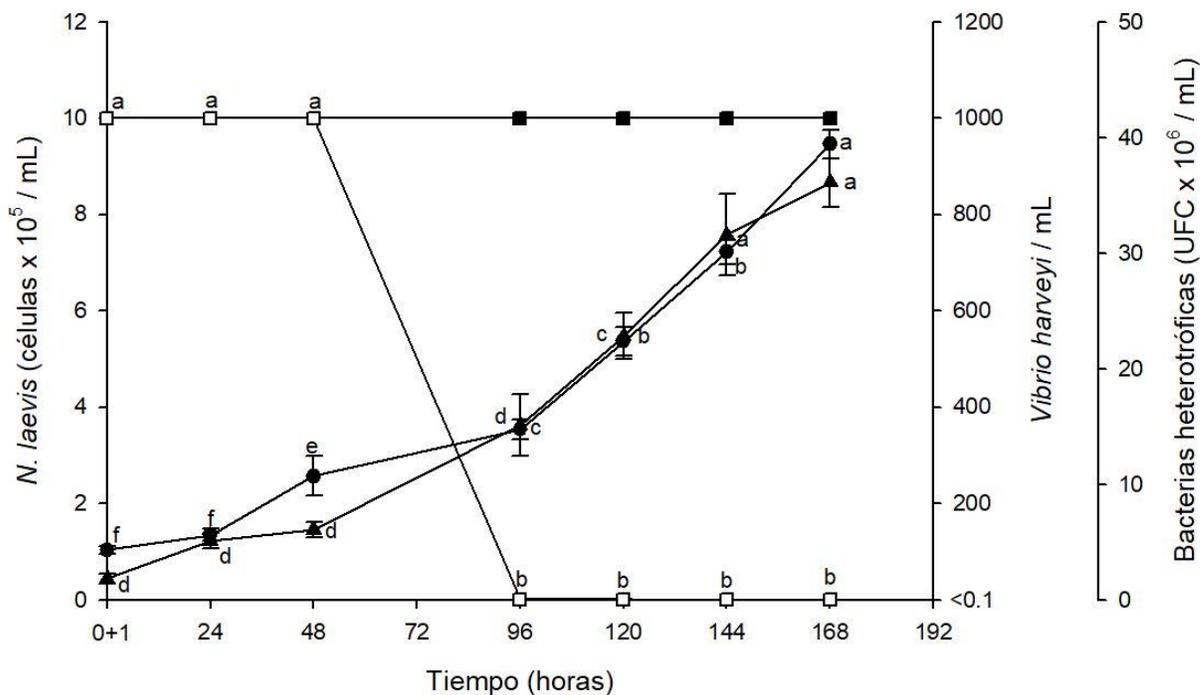
**Figura 39.** Reto de inhibición en cocultivo de *N. laevis* contra *V. alginolyticus*. *N. laevis* (●), *V. alginolyticus* (□), *V. alginolyticus* en medio "F" (■) y bacterias heterotróficas (▲). Filtrado de 1 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $n=3$ .



**Figura 40.** Reto de inhibición en cocultivo de *N. laevis* contra *V. alginolyticus*. *N. laevis* (●), *V. alginolyticus* (□), *V. alginolyticus* en medio "F" (■) y bacterias heterotróficas (▲). Filtrado de 10 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $n=3$ .



**Figura 41.** Reto de inhibición en cocultivo de *N. laevis* contra *V. harveyi*. *N. laevis* (●), *V. harveyi* (□), *V. harveyi* en medio "f" (■) y bacterias heterotróficas (▲). Filtrado de 1 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $n=3$ .



**Figura 42.** Reto de inhibición en cocultivo de *N. laevis* contra *V. harveyi*. *N. laevis* (●), *V. harveyi* (□), *V. harveyi* en medio "f" (■) y bacterias heterotróficas (▲). Filtrado de 10 mL. Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).  $n=3$ .