

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE PESQUERÍA



**“EFECTO INHIBITORIO DE LA MICROALGA
Isochrysis galbana (Haptophyta) SOBRE BACTERIAS
TIPO *VIBRIO spp.*”**

Presentado por:

LILA DEL ROCÍO PARHUAYO HUANCA

TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE

INGENIERO PESQUERO

Lima - Perú

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE PESQUERÍA

**“EFECTO INHIBITORIO DE LA MICROALGA
Isochrysis galbana (Haptophyta) SOBRE BACTERIAS
TIPO *VIBRIO spp.*”**

Presentado por:

LILA DEL ROCÍO PARHUAYO HUANCA

TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE

INGENIERO PESQUERO

Evaluada y aprobada por el siguiente jurado:

**Dra. Doris Zúñiga Dávila
PRESIDENTE**

**Dr. Marcel Gutiérrez Correa
MIEMBRO**

**Mg. Sc. Jessie Vargas Cárdenas
MIEMBRO**

**Dra. Patricia Gil Kodaka
ASESORA**

**Mg. Sc. Carla Aguilar Samanamud
CO - ASESORA**

DEDICATORIA

Desde el fondo de mi ser a *Dios* por ser parte fundamental de mi vida, por todas las bendiciones concedidas y por haberme permitido concluir esta etapa.

Con todo amor a mis queridos padres, *Julio y Claudia*, por haber hecho el gran esfuerzo de ayudarme y apoyarme en todo momento para alcanzar mis sueños. Gracias por ser un magnífico ejemplo de vida y por nunca dejarme caer. Les dedico esta tesis con todo mi corazón.

A mis lindos hermanos *Mariana, Giuliana, Edwar y Julio* por toda la paciencia, amor y apoyo que me brindan.

Al *Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida*, por su dedicación y esmero para enseñarme. Le dedico esta tesis con mucho cariño, como agradecimiento a sus enseñanzas y apoyo.

A todos los *maestros* que en esta etapa, me formaron no sólo con lecciones académicas, sino también con experiencias y ejemplos de vida, a todos y cada uno de ellos les dedico estas páginas.

AGRADECIMIENTO

A mi asesora de tesis, *Dra. Patricia Gil Kodaka*, por aceptar ser mi asesora y guía, por sus enseñanzas, paciencia y apoyo incondicional. Gracias por ser una Gran Maestra y por su inestimable contribución a éste trabajo.

A mi co-asesora de tesis, *Mg. Sc. Carla Aguilar Samanamud*, por aceptarme en el laboratorio de Biotecnología Acuática del Instituto del Mar del Perú, por todas las facilidades brindadas para efectuar la tesis, por su guía y consejos para el desarrollo de la misma.

Al *Dr. Jaime Mendo Aguilar*, por haberme brindado la oportunidad de realizar la estancia de investigación en el Laboratorio de Ecología Molecular del Departamento de Biotecnología Marina del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Baja California, México. Le quedo eternamente agradecida.

Al *Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida*, Director del Laboratorio de Ecología Molecular del CICESE, por el inmenso aporte a mi trabajo, gracias por el apoyo y el soporte que me brindó desde el inicio de la estancia de investigación hasta la ejecución de mi tesis. Lo llevo siempre en mi corazón.

A la *Mg Sc. Nancy Martinez Ordinola*, por facilitarme materiales para el desarrollo de la tesis y por brindarme enseñanzas y su amistad.

A mi gran compañera y guía en el laboratorio de Biotecnología Acuática del IMARPE, *Mg. Sc. Cecil Tenorio*, por su apoyo en el desarrollo de éste trabajo. Así mismo a los profesionales y amigos del IMARPE *Quim. Leenin Flores*, *Blg. Alberto Oscanoa*, *Bach. Hanna Hernández*, *Tec. Marco Aguirre*, *Blg. Violeta Flores*, *Blg. Gheraldine Ynga*, *Blg. Rita Orozco*.

A la *Mg. Sc. Ceres A. Molina Cárdenas*, del CICESE, por sus enseñanzas y consejos para el desarrollo de la investigación. Así mismo a los amigos y profesionales del CICESE, *Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra*, *Mg. Sc. Jairo Paska Fuentes* y *Dr. Abraham Guerrero Ruiz*.

A *Carlos* por tu apoyo incondicional y motivación, gracias por formar parte de mi vida. *Merelyn*, *Sheyla*, *Diana*, *Cecilia*, *Jenny*, *Indira*, *Andrea*, *Kelly*, *Luanna*, *Gabriela*, *Nidia* por ser unas amigas y compañeras ejemplares.

ÍNDICE GENERAL

I. ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE TABLAS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE ANEXOS.....	6
II. RESUMEN	7
EFECTO INHIBITORIO DE LA MICROALGA <i>Isochrysis galbana</i> (Haptophyta) SOBRE BACTERIAS TIPO <i>VIBRIO spp.</i>	7
INHIBITORY EFFECT OF THE MICROALGAE <i>Isochrysis galbana</i> (Haptophyta) ON THE BACTERIA TYPE <i>Vibrio spp.</i>	8
III. INTRODUCCIÓN	9
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	13
<i>Isochrysis galbana</i>	13
<i>Vibrio spp.</i>	15
V. MATERIALES Y MÉTODOS	23
V.1 Características de la cepa de <i>Isochrysis galbana</i>	23
V.2 Cultivo de <i>Isochrysis galbana</i>	23
V.3 Características de las cepas de bacterias utilizadas. Mantenimiento	25
V.4 Halos de inhibición (Lazarus y Bhimba, 2008).....	27
V.5 Análisis Estadístico	28
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
VI.1. Crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> en cultivo axénico.....	30
VI.2. Crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> en cultivo mixto (microalga – bacteria).....	33
VI.3 Diferencias de crecimiento de la microalga <i>I. galbana</i> entre cultivo axénico y cultivo mixto.	36
VI.4 Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio furnisii</i> en cultivos de <i>Isochrysis</i> <i>galbana</i> IMP-BG 010 (cultivo mixto).....	38
VI.5. Halos de inhibición	44

VI.6. Evaluación del Crecimiento de <i>Vibrio spp.</i>	49
VII. CONCLUSIONES	52
VIII. RECOMENDACIONES	53
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
X. ANEXOS	62

ÍNDICE DE TABLAS

Cuadro 1: Tasa de crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> IMP-BG-010 en cultivo axénico, en tres repeticiones (RA, RB y RC), mantenidas en cultivos estáticos y bajo las mismas condiciones de temperatura e iluminación.....	332
Cuadro 2: Tasa de crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> IMP-BG 010 en presencia de <i>Vibrio furnisii</i> en tres repeticiones (RA, RB y RC), mantenidas en cultivos estáticos y bajo las mismas condiciones de temperatura e iluminación.....	35
Cuadro 3: : Análisis de varianza de una vía, para el crecimiento de <i>V. furnisii</i> en cultivo mixto con <i>I. galbana</i> IMP-BG 010. Filtrados de 10ml.....	41
Cuadro 4: Crecimiento de <i>Vibrio furnisii</i> en el tiempo, filtrados de 1ml y 10ml.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica de las interacciones de vibrios en diferentes compartimentos del ecosistema costero. FUENTE: Leyton, Y.; Riquelme, C., 2008. Vibrios en los sistemas marinos costeros. Revista de Biología Marina y Oceanografía 43(3): 441-456	16
Figura 2. Conteo de un cuadro grande de cámara de Neubauer. FUENTE: Bastidas, O.. (s.f.).Technical Note, Neubauer Chamber Cell Counting. Celeromics	24
Figura 3. Recuento con alta concentración celular. FUENTE: Bastidas, O.. (s.f.).Technical Note, Neubauer Chamber Cell Counting. Celeromics	24
Figura 4. Valores promedio de la densidad celular de <i>Isochrysis galbana</i> IMP-BG 010, en tres repeticiones RA (◆), RB (■) y RC (▲), mantenidas en cultivos estáticos y bajo las mismas condiciones de temperatura e iluminación.	31
Figura 5. Análisis de varianza, para el crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> IMP-BG 010, en tres repeticiones (RA, RB y RC), mantenidas en cultivos estáticos y bajo las mismas condiciones de temperatura e iluminación.	31
Figura 6. Valores promedio de la densidad celular de <i>Isochrysis galbana</i> IMP-BG 010 en presencia de <i>Vibrio furnisii</i> , en tres repeticiones RA (◆), RB (■) y RC (▲), mantenidas en cultivos estáticos y bajo las mismas condiciones de temperatura e iluminación.	33
Figura 7. . Análisis de varianza, para el crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> IMP-BG 010 en presencia de <i>Vibrio furnisii</i> , en tres repeticiones (RA, RB y RC), mantenidas en cultivos estáticos y bajo las mismas condiciones de temperatura e iluminación	34
Figura 8. Valor promedio de la densidad de ▲ <i>V. furnisii</i> (BTCBS/ml) en cultivo mixto con ■ <i>I. galbana</i> (células/ml). Filtrados de 1ml.....	38
Figura 9. Valor promedio de la densidad de <i>V. furnisii</i> (BTCBS/ml) en cultivo mixto con <i>I. galbana</i> . Inhibición en el tiempo.	39

Figura 10. Valor promedio de la densidad de ▲ <i>V. furnisii</i> (BTCBS/10ml) en cultivo mixto con ■ <i>I. galbana</i> (células/ml). Filtrados de 10 ml.	40
Figura 11. Valor promedio de la densidad de <i>V. furnisii</i> (BTCBS/ 10 ml) en cultivo mixto con <i>I. galbana</i> . Inhibición en el tiempo.	40
Figura 12: Cromatograma de extracto microalgal de <i>I. galbana</i> (0.1gr) con n-butanol a 254 nm.....	44
Figura 13: Cromatograma de extracto microalgal de <i>I. galbana</i> (0.1gr) con metanol a 254 nm.	45
Figura 14: Halo de inhibición de <i>V. furnisii</i> , extracto microalgal de <i>I. galbana</i> con n-butanol y 0.1gr de pellet (a) y 0.5gr de pellet (b).....	46
Figura 15: Halo de inhibición de <i>V. furnisii</i> , extracto microalgal de <i>I. galbana</i> con metanol y 0.1gr de pellet (a) y 0.5gr de pellet (b).	47
Figura 16. Parámetros de control en el test de sensibilidad de <i>V. furnisii</i> , metanol (a) y n-butanol (b).....	48
Figura 17. a) Cultivo de <i>V. furnisii</i> en agua de mar enriquecida con medio f2, b) Cultivo mixto de <i>V. furnisii</i> e <i>I. galbana</i> en agua de mar enriquecida con medio f2	49
Figura 18. Crecimiento de <i>V. furnisii</i> (BTCBS/ml) en agua de mar enriquecida con medio f2, muestreos a 0, 48, 96 y 168 horas <i>post</i> -inoculación de bacteria mediante filtrados de 1ml y 10ml.	50
Figura 19. Crecimiento de <i>V. furnisii</i> (BTCBS/ml) en cultivo mixto (<i>I. galbana</i>) en agua de mar enriquecida con medio f2, muestreos a 0, 48, 96, 168 y 264 horas <i>post</i> -inoculación de bacteria mediante filtrados de 1ml y 10ml.	51

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Mantenimiento del Cultivo de la Microalga (MA) <i>I. galbana</i>	62
ANEXO 2: Evaluación de la Tasa de Crecimiento	63
ANEXO 3: Cultivo de <i>Vibrio spp.</i>	64
ANEXO 4: Preparación del Inóculo de Bacterias	665
ANEXO 5: Evaluación del Crecimiento de <i>Vibrio spp.</i>	66
ANEXO 6: Ensayo de Inhibición del Crecimiento de <i>Vibrio spp.</i>	67
ANEXO 7: Conteo de Bacterias.....	67
ANEXO 8: Halos de Inhibición	68
ANEXO 9: Proceso de Recuperación de Bacterias.....	69
ANEXO 10: Prueba de Muestras Independientes, para el Crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> IMP-BG 010 en Cultivo Axénico y en Presencia de <i>Vibrio furnisii</i>	70

I. RESUMEN

EFECTO INHIBITORIO DE LA MICROALGA *Isochrysis galbana* (Haptophyta) SOBRE BACTERIAS TIPO *VIBRIO* spp.

La capacidad inhibitoria de la microalga *Isochrysis galbana* fue evaluada sobre *Vibrio furnisii* (reportado como patógeno en acuicultura). Se efectuaron cultivos monoespecíficos, por triplicado, en medio “f2” a una densidad inicial de 1×10^5 células/ml, inoculándose cada cultivo con $\geq 1 \times 10^2$ bacterias que crecen en medio TCBS (BTCBS). Se efectuaron conteos diarios de la microalga y se determinó su tasa de crecimiento. El efecto inhibitorio se evaluó mediante filtrados de 1 y 10 ml del cultivo microalga-bacteria, inmediatamente después de la inoculación, a las 48, 96, 168 horas, y una vez que el cultivo de microalga alcanzara la fase estacionaria de su crecimiento, se efectuaron conteos indirectos de BTCBS. En todas las repeticiones se detectaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) de la concentración de *Vibrio* con respecto al tiempo, hallándose concentraciones indetectables (<0.01 BTCBS/ml) durante la fase exponencial del crecimiento de la microalga. *I. galbana*, presenta un mayor crecimiento y densidad celular en presencia de *Vibrio furnisii* ($\alpha=0.05$) demostrando la propiedad alelopática entre ambas especies. Se efectuó un análisis por HPLC de extractos microalgales (0.1gr de pellet), usando n-butanol y metanol como solventes, se registra mayor presencia de compuestos extracelulares con metanol. Se usaron extractos microalgales con n-butanol y metanol (0.1 y 0.5gr de pellet) para el test de sensibilidad, registrándose halos de inhibición más grandes con metanol (0.5gr de pellet). Se concluye la efectividad y selectividad de *Isochrysis galbana* sobre *Vibrio furnisii*, debido a los metabolitos secundarios que ésta libera, demostrando su uso como agente potencial de biocontrol sobre vibriosis.

Palabras clave: *Vibrio*, *Isochrysis galbana*, inhibición, antibacterial, HPLC, bacteria.

**INHIBITORY EFFECT OF THE MICROALGAE *Isochrysis galbana*
(Haptophyta) ON THE BACTERIA TYPE *Vibrio* spp.**

The inhibitory capacity of *Isochrysis galbana* was evaluated against *Vibrio furnisii* (reported as a pathogen in aquaculture). The microalgae was maintained in monospecific cultures (by triplicate), in “f2” media at an initial density of 1×10^5 células/ml, each culture was inoculated with *Vibrio furnisii* with a density $\geq 1 \times 10^2$ (bacteria is able to grow up in TCBS media, BTCBS). Daily counts of microalgae culture were done to calculate growth rate. The inhibitory effect was evaluated through filtering (1 y 10ml) samples of microalgae-bacteria culture, immediately after the inoculation, at 48, 96, 168 hours and at the time that microalgae were at stationary growth phase, through indirect counts of BTCBS. In all experiments, highly significant differences in the concentration of *Vibrio* over time were found, and undetectable (< 0.01 BTCBS/ml) concentration were detected when microalgae culture were at the exponential growth phase. *I. galbana* showed high growth and cellular density when it was cultured with *V. furnisii* ($\alpha=0.05$), showing the allelopathic property between them. It was done an HPLC analysis with microalgae extracts (0.1gr pellet), using n-butanol and methanol as solvents; it was found that methanol extracts more extracellular compounds than n-butanol. Microalgae extracts with n-butanol and methanol (0.1y0.5gr) were used to make sensibility tests, methanol (pellet 0.5gr) showed big inhibition halos. We conclude the effectivity and selectivity of *I. galbana* against *V. furnisii*, due to the secondary metabolites of microalgae, showing its capacity to be a potential agent of biocontrol against vibriosis.

Keywords: *Vibrio*, *Isochrysis galbana*, inhibition, antibacterial, HPLC, bacteria.

II. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial se da una sobreexplotación de los recursos naturales por la actividad antropogénica efectuada para suplir un largo rango de necesidades, dentro de ellas la más básica e importante la alimentación. La acuicultura se muestra como un sector de producción de alimentos de más rápido crecimiento en el ámbito mundial, se ha establecido como una fuente de proteína para satisfacer la demanda mundial de alimentos en relación a la Seguridad Alimentaria. Paralelamente en relación a ésta, la acuicultura se está transformando en una preocupación debido a los problemas relacionados con contaminaciones microbiológicas y químicas. Los consumidores esperan y exigen que el alimento que compran sea seguro y sano (Shrimp 2001, Chamberlain, Global Aquaculture Alliance). Así mismo la intensificación de los cultivos acuícolas ha llevado a ésta industria a una situación de riesgo, teniendo en la actualidad el mayor problema que enfrenta, las enfermedades causadas por varios agentes biológicos y no biológicos. (FAO, 2009)

Perú no es ajeno a ésta realidad, debido a la gran demanda internacional durante las dos últimas décadas, se han intensificado principalmente los cultivos de langostinos (*Litopenaeus vannamei*) y concha de abanico (*Argopecten purpuratus*). La maricultura, representada básicamente por estas dos especies, alcanza el 73.6 % del total de la actividad en el país. (Desenvolvimiento del Comercio Exterior Pesquero, PromPerú, 2013)

En los sistemas acuícolas, el riesgo a contraer enfermedades causadas por agentes biológicos se incrementa cuando el mecanismo de defensa del organismo en cultivo se ve suprimido debido a diversas causas, entre las más importantes, el stress al que se someten los organismos producto del incremento de la densidad de cultivo, deterioro de los parámetros responsables de la calidad del agua, entre otros. De igual forma en la mayoría de estos sistemas, el riesgo de contaminación y transmisión de patógenos se da básicamente por tres medios: i) los alimentos, ii) suministro de agua, y iii) los reproductores (Lizárraga *et al.*, 1997; López-T *et al.*, 2001) y en algunos casos el uso de post-larvas silvestres (Shrimp 2001, Chamberlain, Global Aquaculture Alliance). La interacción de estos factores conlleva a la disminución de la capacidad inmunológica de los organismos, llevándolos a una condición de mayor vulnerabilidad frente a agentes biológicos patogénicos.

La mayor causa de mortalidad y pérdidas económicas por enfermedades en la acuicultura, se debe básicamente a las vibriosis; diversos estudios han reportado la incidencia de éstos en muchas o casi todas las especies de importancia comercial, debido a que se encuentran en la configuración acuícola a nivel mundial (Gil *et al.*, 2007). Las especies de *Vibrio* varían considerablemente en patogenicidad, esto es relevante debido a que ocasionan numerosos episodios patológicos, casos de mortalidad y grandes pérdidas económicas y alteraciones sociales en la población dedicada a industrias productivas, extractivas y procesadoras de productos del mar (Hernández *et al.*, 2005).

De igual forma, un número significativo de especies de éste género, representan un riesgo para la salud humana, por causar algún tipo de septicemia, gastroenteritis e incluso llegar a convertirse en pandemias, siendo las especies más estudiadas y notificadas *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* y *Vibrio vulnificus* (DePaola *et al.*, 2004; Gil *et al.*, 2007; Rippey *et al.*, 1994; Rosenberg *et al.*, 2002). Otras especies dentro del género, como el *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. furnisii*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus* y *V. hollisae* son patógenos humanos ocasionales, pueden presentar genes de virulencia y causar enfermedades diarreicas tan graves como el cólera (DePaola *et al.*, 2004; Ibarra *et al.*, 1999; Hlady *et al.*, 1996; Rippey *et al.*, 1994; Blake *et al.*, 1980). La severidad de la vibriosis dependerá de la especie en cuestión y de las especies que hayan causado la enfermedad. Las especies anteriormente mencionadas también se encuentran involucradas dentro de las bacteriosis en acuicultura, principalmente en cultivos de moluscos y peces, adicionalmente *Vibrio splendidus* y *Vibrio harveyi* se reportan como causantes de altas mortalidades en ovas y larvas de pectínidos, y están presentes en diferentes relaciones en el ecosistema marino (Le-Roux *et al.*, 2004). Pujalte *et al.* (1999), reportan que *V. splendidus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* o cualquier combinación de estas, son predominantemente asociadas a los bivalvos de diferentes locaciones geográficas.

Las amplias relaciones ecológicas y la capacidad para hacer frente a los cambios climáticos globales, principalmente por el incremento de la temperatura, pueden ser un reflejo de la alta plasticidad del genoma de los vibrios, recientemente se han puesto en relevancia el alto poder patogénico de estos. El incremento de la temperatura es un factor fundamental para entender la dinámica poblacional de los

vibrios, ya que aumentos estacionales de temperatura del agua de mar, inducen de forma directa la proliferación de estos organismos en el medio, consecuentemente el fenómeno El Niño, por sus características, representa un punto de riesgo en la propagación de vibrios patógenos o no (Gil *et al.*, 2007; Colwell *et al.*, 1998; Colwell *et al.*, 1996).

Para mitigar y controlar a estas bacterias, en acuicultura se emplea principalmente antibióticos y alimentos medicados, representando éstos un factor de riesgo ya que se realiza indirectamente una selección de genes de resistencia de las bacterias a los químicos utilizados (Avendaño *et al.*, 2001; Avendaño *et al.*, 1999). Así mismo, se convierten en un problema de tipo ambiental, por la lenta degradación de estos compuestos en las aguas naturales que reciben este tipo de efluentes (Boyd y Massaut, 1999).

Otras estrategias han sido estudiadas y algunas aplicadas, como por ejemplo la fijación de probióticos en el tracto digestivo y gónadas de pectínidos (Avendaño *et al.*, 2001; Avendaño *et al.*, 1999), la interrupción del Quórum Sensing de las bacterias (Defoirdt *et al.*, 2004; Defoirdt *et al.*, 2006). Las estrategias anteriormente mencionadas tienen un gran potencial dentro del control de patologías, sin embargo no ofrecen una opción que mitigue los daños por si sola. (Molina-Cárdenas, 2011).

Dentro de las nuevas estrategias a investigar, se encuentra el estudio y utilización de la capacidad antagónica de ciertos organismos, que mediante la liberación de productos secundarios, tendrían la capacidad de inhibir el desarrollo de otros organismos patógenos, mecanismo de alelopatía, (Molisch, 1937). Las algas han sido estudiadas por sus actividades biológicas, se hallaron componentes antibacteriales en todas las clases algales, y tienen la principal propiedad de ser utilizados como moléculas terapéuticas.

Estos hallazgos son de gran importancia dentro de la acuicultura, porque una fuente importante de alimento, principalmente en estadios tempranos de los organismos cultivados, son las microalgas. La importancia de la *Isochrysis galbana* como recurso, no sólo se encierra dentro del marco de los alimentos en acuicultura, también refleja el inmenso potencial de obtención de subproductos para el consumo humano por el alto contenido de los ácidos grasos poliinsaturados que vuelven a este recurso atractivo, están documentados los beneficios de éstos en la salud humana

(USDA, 1993; López *et al.*, 1996; Liu y Lin, 2001; Lin *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2007; McEwen *et al.*, 2010).

Por otro lado, esta microalga posee alta actividad antibacterial principalmente sobre especies del género *Vibrio* (Kokou *et al.*, 2012; Molina-Cárdenas, 2011; Salvesen *et al.*, 2000), revelando su capacidad antagónica. También actúan como biosintetizadores de nanoestructuras, las mismas que ensayadas contra bacterias patógenas de humanos, demuestran poseer propiedades antimicrobianas, como lo demostró Merín *et al.*, (2010).

Como previamente se ha descrito, ésta microalga, puede ser utilizada, como agente de biocontrol de enfermedades en un sistema acuícola, lo que contribuirá al desarrollo de una acuicultura con menor impacto ambiental al disminuir el uso de químicos y alimentos medicados, reducción de los costos económicos de la producción y aumento en la rentabilidad de la industria.

En el presente trabajo de investigación, *I. galbana* aislada en Ilo, se muestra como especie potencialmente productora de metabolitos secundarios con actividad antibacterial. Se evaluó la capacidad inhibitoria de la *I. galbana* (cepa IMP-BG 010) sobre *Vibrio furnisii*, patógeno de importancia acuícola y en la salud humana, así mismo se comparó la densidad celular y la tasa de crecimiento de la microalga en cultivo axénico y en cultivo mixto (microalga-*Vibrio spp.*)

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

Isochrysis galbana

Isochrysis galbana es una microalga, capaz de producir elevadas cantidades de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), atractivos por su importancia en la acuicultura y por su relación con la salud humana, especialmente el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) (Kaplan, 1986; López *et al.*, 1996; Liu y Lin, 2001).

Dentro de la acuicultura se sabe que los PUFA son componentes esenciales en la nutrición de moluscos bivalvos, crustáceos y peces, habiéndose demostrado que el desarrollo adecuado y la capacidad de supervivencia de los moluscos bivalvos y de las fases tempranas de los peces depende de una dieta rica en EPA y en DHA (Kaplan *et al.*, 1986; López *et al.*, 1996; Albentosa *et al.*, 1996; Liu y Lin , 2001; Lin *et al.*, 2007; Carvajal (s.f.)). Así mismo, mediante el suministro de dietas enriquecidas con *I. galbana* se ha logrado un mayor retorno de semillas y tamaño de las mismas en cultivos de moluscos, *Argopecten purpuratus* (Carvajal *et al.*, (s.f.)).

En relación a su importancia para la salud humana, se ha demostrado su relación con la prevención y el tratamiento de arterioesclerosis, trombosis, artritis, diabetes y algunos tipos de cáncer (USDA, 1993; López *et al.*, 1996; Liu y Lin, 2001; Lin *et al.*, 2007; McEwen *et al.*, 2010), también posee propiedades anti-tumorales (Lu *et al.*, 2007).

Esta cepa microalgal crece adecuadamente a una temperatura de 18°C a 25°C, en un pH de 7 a 9,5, preferentemente a un pH de 7,65 a 8,00 (Albentosa *et al.*, 1996; Austin *et al.*, 1999).

La microalga también se muestra prominente para su utilización como vector, en la fijación de bacterias probióticas, que tienen la habilidad de producir sustancias inhibitorias (BPI por sus siglas en ingles), en el tracto digestivo y gónadas de las larvas y reproductores de moluscos, como por ejemplo *Argopecten purpuratus* (Avendaño *et al.*, 1999, 2001) y actuar como microorganismos antagónicos a los posibles patógenos que se puedan introducir y establecerse dentro de la larva y de esta manera disminuiría la tasa de mortalidad de la especie en cultivo. Este efecto se hace posible debido a que usualmente se utilizan microalgas para la alimentación de las larvas de moluscos, convirtiéndose éstas en vectores de transmisión de organismos patógenos (Subrash *et al.*, 2004) o benéficos; por otro lado, existe un

grupo de BPI que pueden crecer en los productos extracelulares que libera la *I. galbana*, así como el crecimiento de la microalga no se ve afectado significativamente al realizarse el cultivo mixto (microalga-BPI). (Avendaño *et al.*, 1999).

Dentro del creciente e imparable campo de la nanotecnología, la obtención de nanopartículas de alto beneficio en diversos ámbitos, implica la utilización de materiales tóxicos, por lo complejo de sus procedimientos, es por ello que es creciente la demanda de nuevas tecnologías y medios que permitan la obtención de nanopartículas ambientalmente amigables, o la denominada “*Green nanotechnology*”, las investigaciones muestran la capacidad de los microorganismos como bacterias, levaduras, hongos, extractos de plantas y hasta microalgas como biosintetizadores de nanopartículas de gran importancia que juegan un rol importante dentro de la remediación de metales tóxicos mediante la reducción de iones metálicos. Es en este contexto, que la *I. galbana* junto a otras microalgas fueron utilizadas para sintetizar nanoestructuras de metales nobles como la plata (Ag), las nanopartículas de plata sintetizadas por la *I. galbana* se mostraron eficientes al ser probadas contra patógenos humanos como *E. coli*, *Klebsiella* spp., *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, demostrando su capacidad antibacteriana (Merin *et al.*, 2010).

En un estudio de algas planctónicas marinas para la actividad antibacteriana (Duff, Bruce y Antia, 1966) se reveló un amplio rango de actividad en muchas especies de algas, dentro de las cuales la *Skeletonema costatum* y la *I. galbana*, mostraron ser las más prometedoras para investigaciones futuras. Es así que en otro estudio efectuado por Duff *et al.* en 1967, se revela que la investigación sobre *I. galbana* se centra en la caracterización de los productos responsables de la actividad antibacteriana, la cual se atribuye tentativamente al efecto de dos componentes activos derivados de la clorofila *a* y la feofitina *a*. Así mismo, Salvesen *et al.*, 2000, revelaron que en el análisis de carga bacteriana de un cultivo que incluía la *I. galbana*, no se halló o hubieron bajos niveles de *Vibrio* spp., demostrándose así el efecto antibacteriano que tiene la *I. galbana* especialmente sobre bacterias del género *Vibrio*. De igual forma Molina-Cárdenas, C. A. (2011), demostró la actividad antibacteriana de diferentes especies de microalgas sobre bacterias del género *Vibrio*, concluyendo que la *Isochrysis galbana* era la que presentaba la mayor actividad antibacteriana sobre las bacterias en mención, *Vibrio alginolyticus* fue la especie que presentó la mayor

susceptibilidad a la inhibición, mientras que la especie más resistente a la inhibición fue *Vibrio harveyi*; así mismo demostró que los cultivos de las especies de microalgas soportaron altas densidades de bacterias heterotróficas, indicando un efecto selectivo de los compuestos antibacterianos sobre especies del género *Vibrio*. Molina-Cárdenas, C. A. (2011) recomienda llevar a cabo la identificación y caracterización del compuesto que posee actividad antibacteriana, realizar estudios que permitan elucidar el mecanismo de acción y toxicidad del compuesto de interés, aumentar la cantidad de especies de bacterias a utilizar en los ensayos para conocer el espectro de inhibición del compuesto producido, entre otros; Kokou *et al.* (2012) refuerzan los hallazgos de Molina-Cárdenas, demostrando la selectividad de los compuestos antibacteriales de la *I. g.* hacia el género *Vibrio*.

La *Isochrysis galbana* no sólo libera sustancias antibacteriales, a su vez éstas se convierten en sustancias antialgales, principalmente cuando la microalga alcanza la fase exponencial y estacionaria de su crecimiento, este efecto de inhibición tentativamente se le atribuye a la presencia de los ácidos oleico y esteárico y a la combinación de ambos, presentes en los productos extracelulares de la microalga. (Proceedings of 2010 3rd International Conference on Future BioMedical Information Engineering)

Vibrio spp.

Los vibrios, son un grupo de bacterias con múltiples interacciones con los demás componentes del ecosistema marino. Varias especies pertenecientes al género *Vibrio* son indispensables para la supervivencia y subsistencia de numerosos organismos marinos (DeLoney-Marino *et al.*, 2003; Nyholm *et al.*, 2000; Nyholm, and McFall-Ngai, 2003), mientras que otros son patógenos (Leyton y Riquelme, 2008).

Los miembros del género *Vibrio* (*Cepas vibronaceae*), se definen como bacterias Gram-negativas, que pertenecen a la Gammaproteobacteria, asporógenos con flagelos que son rectos o a veces tienen un solo flagelo curvo y rígido (DePaola y Kaysner, 2004). Tienen máxima movilidad; la mayoría tiene un solo flagelo polar, cuando crecen en un medio líquido. Son mesófilos y quimioorganotróficos, tienen un metabolismo de fermentación facultativa, y se encuentran en hábitats acuáticos (Glenn Morris, 2003) y en asociación con los eucariotas. Por lo general son capaces de crecer en agar marino y en el medio selectivo Tiosulfato-Citrato-Sales de Bilis-

Sucrosa (TCBS), generalmente requieren de sal (NaCl) para su crecimiento y la mayoría son oxidasa positivos (Thompson *et al.*, 2004; López-T. y Lizárraga, 2001).

Los vibrios son altamente abundantes en ambientes marinos, incluyendo estuarios, aguas costeras marinas y sedimentos, y en la configuración de la acuicultura alrededor del mundo (Gil *et al.*, 2007). Muchos estudios han demostrado que los vibrios aparecen en altas densidades particularmente en organismo marinos, corales (Rosenberg y Ben-Haim, 2002), peces (Arias, Garay y Aznar, 1995; Grisez *et al.*, 1997; Ringo y Birkbeck, 1999; Huys *et al.*, 2001), moluscos (Sawabe *et al.*, 2003), pasto marino, esponjas, como los langostinos (Gomez-Gil *et al.*, 1998) y zooplancton (López-T y Lizárraga, 2001; Thompson *et al.*, 2004).

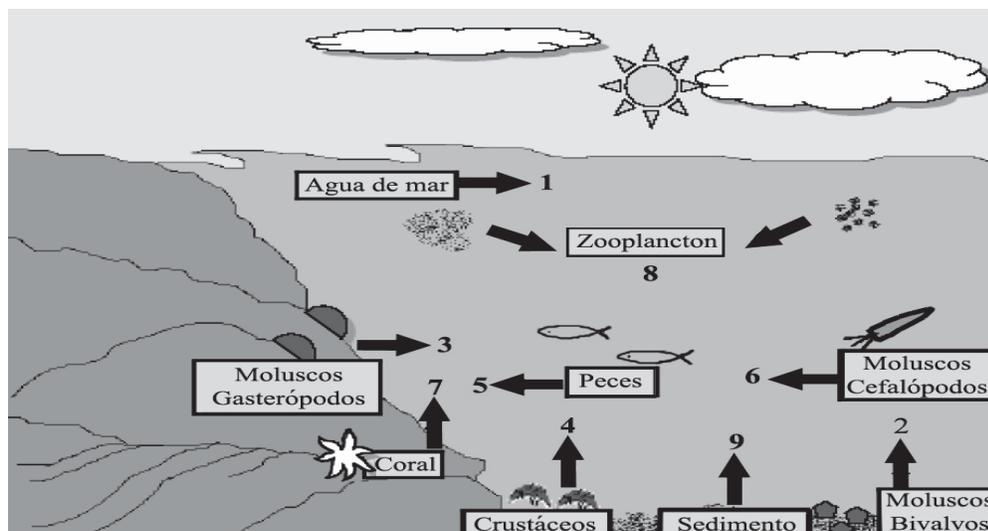


Figura 1: Representación gráfica de las interacciones de vibrios en diferentes compartimentos del ecosistema costero. FUENTE: Leyton, Y.; Riquelme, C., 2008. Vibrios en los sistemas marinos costeros. Revista de Biología Marina y Oceanografía 43(3): 441-456

Las amplias relaciones ecológicas y la capacidad para hacer frente a los cambios climáticos globales, pueden ser un reflejo de la alta plasticidad del genoma de los vibrios. Recientemente, una serie de informes han puesto de relieve el potencial patogénico de los vibrios hacia los seres humanos y animales marinos (por ejemplo, corales, gorgonias y langostinos), que puede ir acompañado del aumento de la temperatura del agua del mar debido al calentamiento global (Thompson *et al.*, 2004; Balakrish *et al.*, 2007). La temperatura es un factor fundamental para entender la dinámica poblacional de los vibrios, ya que aumentos estacionales de temperatura del agua de mar, inducen de forma directa la proliferación de estos

organismos en el medio, alcanzando generalmente mayores densidades en las épocas de mayor temperatura, siempre y cuando los niveles de salinidad en esas épocas sean los óptimos para su expansión demográfica (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Gavilán y Martínez-Urtaza, 2011). Entonces, como Colwell (1996) bien expresa, el fenómeno del Niño por sus características, como el incremento de la temperatura del agua del mar, representa un punto de riesgo en la propagación de los vibrios patógenos o no (Colwell, 1996; Colwell y Patz., 1998); También, Gil *et al.* (2007) sostienen que la presencia del fenómeno de El Niño, y los cambios climáticos que ocasiona en el medio marino, favorecen la aparición de los brotes epidémicos por *V. parahaemolyticus.*, siendo necesaria la implementación de un sistema de vigilancia para *V. p.* y que se le considere como uno de los agentes etiológicos causantes de gastroenteritis grave en el Perú. (Gil *et al.*, 2007).

Los vibrios representan una proporción significativa de las infecciones humanas y gastroenteritis por el consumo de mariscos (productos pesqueros) crudos o con cocción deficiente; tres especies del género *Vibrio*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Glenn Morris, 2003; Balakrish *et al.*, 2007), han sido bien documentados como patógenos humanos. Las infecciones causadas por estos patógenos, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, tienen una creciente importancia en salud pública debido a que han sufrido un imparable incremento en su incidencia a nivel mundial durante las últimas décadas (Aliaga *et al.*, 2010). Ambas especies son consideradas emergentes y presentan una distribución mundial (DePaola y Kaysner, 2004). Otras especies dentro del género como el *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. furnisii*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus* y *V. hollisae* son patógenos humanos ocasionales, pueden presentar genes de virulencia y causar enfermedades diarreicas tan graves como el cólera. (Blake *et al.*, 1980; Rippey, 1994; Hlady y Klontz., 1996; Ibarra *et al.*, 1999; DePaola y Kaysner., 2004).

Solamente una minoría de especies del género *Vibrio* son realmente patógenos, y se refuerza la idea de que las otras especies del género son oportunistas (Glenn Morris., 2003), especialmente si las condiciones ambientales disparan la multiplicación de las bacterias que son toleradas en bajos niveles y cuando los sistemas de defensa natural del huésped se encuentran suprimidos (Venkateswara, 2009).

Dentro de la acuicultura, *V. anguillarum*, *V. salmonicida*, y *V. vulnificus* son bacterias patógenas de muchas especies de peces (Austin, B. y Austin, D. A., 1999) y el *V. harveyi* es el mayor patógeno de los langostinos, como por ejemplo *Litopenaeus vannamei* y *Penaeus monodon* (Austin *et al.*, 2003). La mortalidad causada por vibrios es muy común en cultivos de peces y moluscos, especialmente en las primeras etapas, se puede dar de manera repentina y ocasionar la muerte de la población entera (Borrego *et al.*, 1996); convirtiéndose las bacteriosis en la mayor fuente de pérdidas económicas (Vandenberghe *et al.*, 1999). Estas patologías han sido reportadas desde 1960, pero no es sino hasta esta última década que se ha reportado una gran mortalidad debido a estos microorganismos (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010).

Tamayo *et al.*, (s.f.) manifiesta que la vibriosis es una enfermedad presente en todos los crustáceos marinos, los langostinos son los más susceptibles. Las epizootias ocurren en todos los estadios de vida. Las mayores epizootias de vibriosis han sido reportadas para *Penaeus Monodon* en la región Indo-Pacífico, *Penaeus Japonicus* de Japón, y *Penaeus Vannamei* de Ecuador, Perú, Colombia y América Central, ésta se expresa en diferentes síndromes, estos incluyen: vibriosis oral y entérica, vibriosis de los apéndices y cuticular, vibriosis localizadas en las heridas, enfermedad de la concha, vibriosis sistémica y hepatopancreatitis séptica. Los langostinos que la sufren pueden presentar lesiones localizadas en la cutícula de coloraciones marrones o negras, también aparecen en los apéndices y branquias, ocasiona pérdida de miembros, musculatura blanda, infección localizada en el intestino o hepatopáncreas y/o septicemia general.

El modo de infección en los peces se da en tres básicos pasos (Gomez-Gil *et al.*, 1998): i. la bacteria penetra al tejido del hospedero con la motilidad quimiotáctica, ii. Dentro del tejido del hospedero, la bacteria despliega sistemas de secuestro de hierro, que extraen el hierro del hospedero, iii. La bacteria eventualmente daña al pez por medio de los productos extracelulares como por ejm. Hemolisinas y proteasas.

Los síntomas internos de la enfermedad en el pez causada por especies de vibrios incluyen la necrosis intestinal, anemia, fluido ascítico, hemorragias petequiales en el tejido muscular, líquido en la vejiga natatoria, hemorragia o exudado

sanguinolento en el peritoneo, intestino inflamado, hemorragia en o sobre los órganos internos, hígado pálido moteado (Gomez-Gil *et al.*, 1998). Los síntomas externos incluyen movimiento lento, errático o en espiral, letargia, pigmentación oscura, daños en el ojo como la exoftalmia, hemorragia en la boca, deterioro de las branquias, o piel, putrefacción de la aleta, hemorragia en la base de las aletas, abdomen distendido, hemorragia en la superficie de los músculos, úlceras y hemorragia alrededor del ano. (Thompson *et al.*, 2004).

Dentro de los cultivos en acuicultura los vectores de transmisión de bacterias patógenas y enfermedades, está constituido básicamente por tres elementos, el agua, los alimentos y los reproductores (Lizárraga, 1997). En ese sentido como expresa Salvesen *et al.* (2000) “la alimentación con microalgas representa una repetitiva y sustancial fuente de inoculación bacteriana en la larvicultura marina, entonces esto podría tener un impacto significativo, cuantitativo y cualitativo, en la microflora del agua y de las larvas”.

En los sistemas de cultivo de langostinos se han reportado al menos 14 especies de *Vibrio*, las cuales son: *Vibrio harveyi*, *V. splendidus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. campbelli*, *V. fischeri*, *V. damsella*, *V. pelagicus*, *V. orientalis*, *V. ordalii*, *V. mediterrani*, *V. logei*, etc. (Balakrish *et al.*, 2005; Venkateswara. 2009), adicionalmente señala la presencia de *V. mimicus* como agentes constituyentes de la microflora de langostinos cultivados en arrozales. De todos los mencionados, *Vibrio alginolyticus* esta predominantemente presente en todas las etapas larvales y está asociado con saludables nauplios y en los estados de zoea de los penaeideos (Vandenberghe *et al.*. 1999). Similarmente Sainz *et al.*, (1998) dentro de un estudio que realizaron, citan que una de las principales causas de muerte en larvas de moluscos, es la presencia de *V. alginolyticus*, reportándose una dosis infectiva igual o superior a 5.0×10^5 UFC ml⁻¹. Pujalte *et al.*, (1999) en un estudio sobre la diversidad de especies de *Vibrio* encontraron que las especies predominantemente asociadas a los bivalvos de diferentes locaciones geográficas son *V. splendidus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* o cualquier combinación de estas especies, reafirmando este hallazgo Arias *et al.*, (1999) encontraron que *V. splendidus* y *V. harveyi* son las especies que más prevalecen en bivalvos silvestres, Montilla *et al.* (1995) también reconocen la prevalencia de *V. splendidus*, pero también reportan altas proporciones de cepas de

V. tubiashii como lo hizo Castro *et al.*, (2002) quien también reconoció *V. harveyi* como una especie abundante. (Beaz-Hidalgo, 2010).

Vibrio splendidus esta comúnmente distribuido en los ecosistemas marinos, muchas cepas han sido relacionadas con la mortalidad en ovas o larvas de pectínidos (Nicolas *et al.*, 1996), turbot *Scophthalmus maximus* (Gatesoupe *et al.*, 1999), y la ostra *Crassostrea gigas* (Sugumar *et al.*, 1998; Lacoste *et al.*, 2001; Waechter *et al.*, 2002). (Le-Roux *et al.*, 2004).

Los métodos que se emplean para controlar a estas bacterias en los sistemas de producción acuícola son numerosos, dentro de ellos tenemos el uso de probióticos, antibióticos (Gibson *et al.*, 1998), principalmente mediante su aplicación en los alimentos, lo cual supone una medida de solución a corto plazo, sin embargo los efectos a futuro pueden llegar a ser catastróficos pues progresivamente se va seleccionando genes de resistencia de los patógenos, el uso de los antibióticos puede traer efectos ecológicos adversos, ya que pueden desarrollarse poblaciones bacterianas resistentes, o transmitir la resistencia a los patógenos humanos (Lai *et al.*, 2009), su uso es cada día más limitado en el ámbito mundial, debido a la capacidad que poseen las bacterias de desarrollar una múltiple resistencia a estas sustancias (Riquelme *et al.*, 1994; Riquelme *et al.*, 1996; Skjermo y Vadstein, 1999) y a la lenta degradación de estos compuestos, los cuales causan graves perturbaciones medio ambientales en las aguas naturales que reciben este tipo efluentes (Boyd y Massaut, 1999). Una medida alternativa a estos compuestos antibacterianos es el control biológico (Avendaño y Riquelme, 1999; Avendaño *et al.*, 2001).

En las últimas décadas se ha descubierto que las bacterias son capaces de comunicarse entre sí y que éstas viven en comunidades, donde la conducta individual está coordinada por la comunicación célula-célula por medio de pequeñas señales moleculares denominadas Quórum sensing (QS). Las bacterias usan el QS para supervisar su densidad poblacional, sincronizar su comportamiento y actuar recíprocamente (Van *et al.*, 2007); esto permite que las bacterias sincronicen el comportamiento de grupo como unidades multicelulares (Lenz y Bassler, 2007), para interactuar con el medio ambiente y organismos superiores (Bjarnsholt y Givshov, 2007). Teóricamente, podría ser que el aumento de la

densidad de moléculas señales se deba a la limitación por espacio alrededor de la célula o por alteración de la difusión de moléculas autoinducidas que puede aumentar el número celular como lo han discutido Redfield *et al.*, (2002).

Hoy en día para controlar las enfermedades bacterianas en acuicultura se usan antibióticos (Cabello, 2006), al respecto, se ha sugerido la interrupción del QS como una estrategia antibacteriana (Defoirdt *et al.*, 2004); Sin embargo, los datos sobre el impacto del QS que detecta la virulencia de patógenos acuáticos son escasos (Defoirdt *et al.*, 2005). Estudios realizados por Defoirdt *et al.*, (2005) indican que la interrupción del QS podría ser una buena estrategia para combatir infecciones por *Vibrio harveyi* en el cultivo de *Artemia franciscana*. Otros estudios han demostrado que, *Aliivibrio fischeri* y *Vibrio logei* se encuentran en asociación simbiótica con el calamar *Sepiolla spp.* y pueden detectar su densidad celular por medio de señales moleculares o feromonas (ejemplo Nacilhomoserinalactonas) de tal modo regular la bioluminiscencia (Wolfe *et al.*, 2004). Igualmente, se ha documentado la capacidad de monitorear la densidad celular y regular la expresión de genes de virulencia por medio del QS para los patógenos *V. anguillarum* (Miltonet *et al.*, 1997), *V. cholerae* (Zhu y Mekalanos, 2003), *V. harveyi* (Lilley y Bassler, 2000), *V. parahaemolyticus* (Henke y Bassler, 2004) y *V. vulnificus* (McDougald *et al.*, 2000).

Naviner *et al.* (1999), señala que el descubrimiento de nuevas moléculas terapéuticas se está volviendo crecientemente importante tanto como las bacterias se vuelven resistentes a los antibióticos usuales. Tradicionalmente utilizadas en medicinas asiáticas, las algas, desde la segunda mitad del siglo XX, han sido estudiadas por sus actividades biológicas. Es así que se hallaron componentes antibacteriales en todas las clases algales, sin embargo la mayoría de estas acciones antibacteriales se han probado sólo contra patógenos humanos y las moléculas activas fueron pocas veces purificadas.

De igual forma existen estudios mixtos, donde se puede apreciar la utilización de control biológico mediante la utilización de bacterias probióticas y el uso de fitoplancton como una técnica más efectiva de biocontrol (Sharifah y Eguchi (s.f.)).

De esta forma se puede observar el inmenso potencial que representan las microalgas marinas por la utilización de sus metabolitos secundarios, los mismos que tienen propiedades antibacteriales, reconociendo en ellas su capacidad antagónica frente a los organismos patógenos, enmarcándonos netamente dentro del concepto de control biológico o biocontrol.

Molina-Cárdenas (2011), expresa: “debido a que el efecto antibiótico de una especie en particular no es el mismo en todas las especies de bacterias patógenas, y aunado al reciente interés y poco conocimiento en ésta área, es necesario hacer investigaciones que ayuden a identificar más especies y más compuestos que podrán brindar una solución a las bacteriosis causadas por *Vibrio spp.* en organismos de interés en la acuicultura”.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Características de la cepa de *Isochrysis galbana*

Los cultivos de *I. galbana* con los que se desarrolló la investigación fueron tomados a partir de una cepa axénica (microalga libre de otro microorganismo), de *Isochrysis galbana*, IMP-BG 010, aislada en Ilo (2009), del Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos del Área de Biotecnología Acuática, perteneciente al Instituto del Mar del Perú (IMARPE).

V.2 Cultivo de *Isochrysis galbana*

V.2.1. Mantenimiento del cultivo de la microalga

Se realizaron cultivos axénicos y sin aireación. Para la preparación del medio de cultivo se utilizó agua de mar filtrada, sedimentada, se esterilizó a 121°C durante 20 minutos.

Para el cultivo se utilizó un matraz Erlenmeyer de 125ml, el mismo que contenía 100ml de agua de mar estéril con medio “f2” (Guillard y Ryther, 1962). Se realizó un mantenimiento semanal, que consistió en inocular con un volumen de cultivo del 10% del cultivo inicial, y se transfirió a un nuevo medio, el cual fue exactamente igual al cultivo de inicio. El cultivo se mantuvo a una temperatura de 26°C y con irradiancia continua de luz blanca fría.

En el Anexo 1 se muestra el flujo del mantenimiento del cultivo de la microalga *Isochrysis galbana*.

V.2.2. Evaluación de la tasa de crecimiento.

Con el fin de evaluar la tasa de crecimiento de la microalga en cultivo axénico, se efectuaron cultivos de la microalga por triplicado en matraces Erlenmeyer de 500 ml. Se utilizó medio “f2”, a una temperatura de 26°C y se les suministró iluminación continua.

Para medir el crecimiento se utilizó un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad y un microscopio compuesto (Nikon 550), con el fin de efectuar conteos celulares diariamente. Para evaluar la tasa de crecimiento se utilizó la ecuación descrita por Fogg y Thake (1978).

$$\text{Tasa de crecimiento} = (\log_2 N_2 - \log_2 N_1)/(T_2 - T_1)$$

N: Número de células

T: Tiempo (Días)

Se evaluó la tasa de crecimiento de la microalga en cultivo axénico, para observar si se mantiene la misma tasa de crecimiento o cambia cuando se efectúe el cultivo mixto (microalga – *Vibrio spp.*)

V.2.2.1. Conteo celular con hematocitómetro

- Preparación de la muestra:

Se prepararon muestras con una concentración apta para su recuento, aplicando las diluciones correspondientes de ser necesario.

- Introducción de la muestra en la cámara de Neubauer:

Se tomó 10 uL de la mezcla preparada con la micropipeta.

- Recuento de células

Si las células tocaron el límite superior o el límite izquierdo del cuadro, se contabilizaron, pero no se contabilizaron si tocaron el límite inferior o el límite derecho. (Fig. 2)

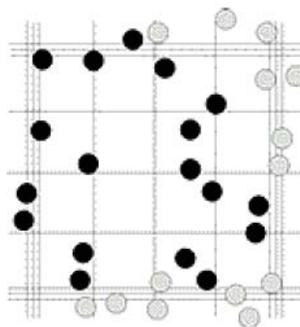


Figura 2: Conteo de un cuadro grande de cámara de Neubauer. FUENTE: Bastidas, O.. (s.f.).Technical Note, Neubauer Chamber Cell Counting. Celeromics

En caso de que la concentración celular haya sido muy alta, se utilizó el orden de conteo en forma de zig-zag, como el descrito en la Fig. 3.

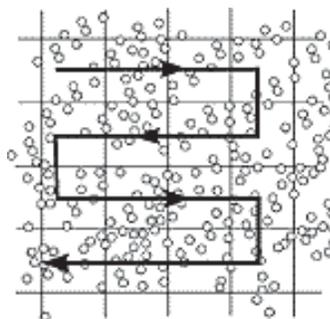


Figura 3: Recuento con alta concentración celular. FUENTE: Bastidas, O.. (s.f.).Technical Note, Neubauer Chamber Cell Counting. Celeromics

- Cálculo de la concentración:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} \times 10\,000}{\text{número de cuadros} \times \text{dilución}}$$

Ejemplo:

Para una dilución de 1 : 10. Dilución = 0,1

Para una dilución de 1 : 100, Dilución = 0,01

En el Anexo 2 se encuentra el flujograma de la evaluación de la tasa de crecimiento de la microalga *I. galbana*.

V.3 Características de las cepas de bacterias utilizadas. Mantenimiento

Las bacterias para el experimento, *Vibrio alginolyticus*, *V. furnisii*, *V. splendidus*, y *V. parahaemolyticus*, pertenecen a la colección CICESE, estas proceden de colecciones de referencia principalmente de la ATCC (American Type Culture Collection), mismas que se encuentran en el Laboratorio de Ecología Molecular del Departamento de Biotecnología Marina del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Baja California, México.

V.3.1. Cultivo de *Vibrio spp.*

Cada especie de bacteria se obtuvo a partir del cultivo de una colonia proveniente de un vial de vidrio que contiene 10 ml de medio Zobell (DIFCO). Se tomó una colonia del vial y se sembró en una placa Petri que contenía 20 ml de medio zobell, y se llevó a incubar de 24 horas a 26°C.

En el Anexo 3 se halla el flujo de cultivo de *Vibrio spp.*

V.3.2. Evaluación del Crecimiento de *Vibrio spp.*

Para poder evaluar el crecimiento de la población bacteriana en condiciones normales en el medio f2 (sin intervención de la microalga y sus metabolitos respectivos), se inoculó la bacteria (Concentración inicial 10^2 UFC/ml) en tres matraces Erlenmeyer que contuvieron 200 ml de medio f2. Se efectuaron conteos diarios (conteo indirecto en placas), hasta que la población bacteriana alcanzó el tiempo paralelo a la fase estacionaria de la microalga. (Para efectos de comparación con el cultivo mixto), mediante filtrados de 1 y 10ml en medio TCBS, se incubó a 28°C durante 24 horas.

Los cultivos se mantuvieron a 26°C e irradiación continua de luz blanca fría. En el Anexo 4 se halla descrito el flujo de Evaluación del crecimiento de *Vibrio spp.*

V.3.3. Preparación del inóculo de bacterias

Antes de dar inicio al experimento, se preparó tubos de cultivo con 9ml de suero fisiológico, el cual se elaboró disolviendo 9g de NaCl en 1 litro de agua destilada. Se distribuyó la solución en los tubos de cultivo y se esterilizó por 20 min a 120°C y a 1.05 Kg/m² de presión. Después de esterilizarlos, se dejaron enfriar y se almacenaron para su posterior utilización.

De un tubo de cultivo con suero fisiológico estéril, se tomó 2ml y se vertió en la placa Petri sembrada densamente de la bacteria (*Vibrio spp.*). Se raspó cuidadosamente las colonias de bacterias formadas, sin extraer el agar, a modo de realizar un lavado, terminado el proceso, se retiró el líquido formado de apariencia lechosa y se regresó al tubo de cultivo. Se procedió a agitar vigorosamente la mezcla y se dejó reposar por 30 minutos, así se facilitó que los agregados de bacteria se disuelvan. Seguidamente se tomó otro tubo de cultivo con suero fisiológico estéril y se adicionaron gotas del tubo de cultivo preparado anteriormente, en promedio 2 gotas, para alcanzar un densidad óptica de 0.05 medido a 600nm, lo que en promedio equivaldrá a una concentración de 1×10^6 UFC/ml (Anguiano-Beltran, 1996)

En el Anexo 4 se describe el flujo de la preparación del inóculo de bacterias.

V.3.4. Ensayo de inhibición del crecimiento de *Vibrio spp.*

Con el fin de evaluar la inhibición de la microalga *I. galbana* sobre *Vibrio spp.*, se efectuaron cultivos por triplicado en matraces Erlenmeyer con 200 ml de medio “f2”. A cada matraz se añadió 1 ml del tubo de cultivo cuya preparación se indicó anteriormente (V.3.3), finalmente se obtuvo una concentración de 10^2 UFC/ml aproximadamente. El número de células a sembrar de la microalga, se calculó a partir del cultivo madre para obtener una concentración de 100,000 células/ml en cada matraz. Se iluminaron los cultivos de microalga-bacteria (cultivo mixto) con lámparas fluorescentes a una irradiancia continua y a una temperatura de 26°C.

El flujo del ensayo de inhibición del crecimiento de *Vibrio spp.* se halla en el Anexo 6.

V.3.5. Conteos de bacterias

Para conocer la cantidad de bacterias que crecen en medio Tiosulfato Citrato Bilis Sucrosa (BTCBS) (Medio TCBS, Difco), presentes en los cultivos mixtos (microalga-*Vibrio spp.*), se efectuaron conteos indirectos en placa. Se filtraron 1 y 10 ml de cada cultivo de microalga, de manera individual. Los filtrados de 10ml se efectuaron para comprobar la ausencia de BTCBS a mayor concentración. Para efectuar los filtrados, se utilizaron filtros estériles de nitrocelulosa de 47mm de diámetro y una luz de malla de 0.22 μ (millipore). Los filtros con la muestra obtenida se colocaron en cajas Petri con medio TCBS, de 6cm de diámetro. Todo el procedimiento detallado, se repitió a penas se inoculó con la bacteria, también después de 48, 96, 168 horas post-inoculación y una vez que el cultivo de microalga alcanzó la fase estacionaria (Molina-Cárdenas, 2011; Kokou *et al.*, 2012). Las placas con cultivo se incubaron a una temperatura de 26°C durante 24h y se realizó el conteo de las colonias que crecieron durante el periodo de incubación, las mismas que quedaron expresadas en unidades formadoras de colonia presentes en 1ml (UFC/ml).

El flujo del Conteo de bacteria se halla en el Anexo 7.

V.4 Halos de inhibición (Lazarus y Bhimba, 2008)

V.4.1. Separación de la microalga:

Se cultivó la microalga (4Lt) durante 15 días, partiendo de una concentración inicial de 10^5 cels/ml; el día 15 se centrifugó el cultivo a 3000 rpm durante 10 minutos, se lavó tres veces los pellets de microalga, con agua ultrapurificada y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante.

V.4.2. Preparación de los antimicrobianos crudos de la microalga marina:

Cada 0.1gr y 0.5gr de pellet se mezcló con el solvente seleccionado n-butanol y adicionalmente con metanol, se homogeneizó usando ultrasonido durante dos minutos, se refrigeró la mezcla a 5°C durante 12 horas, posteriormente se sometió a ultrasonido por dos minutos para homogeneizar, y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Se recolectó el sobrenadante para su uso posterior.

Para determinar la presencia de metabolitos secundarios, responsables de la inhibición de *V. furnisii*, se realizó una corrida en HPLC (*Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento*). Para lo cual se procedió de la forma anterior para obtener

extractos microalgales, con la diferencia de que el pellet de microalga a utilizar fue de 0.1gr, se usaron los solventes (n-butanol y metanol) como parámetros de control.

V.4.3. Ensayo Antibacterial - Test de sensibilidad

Los extractos de la microalga se impregnaron por separado en discos estériles, de papel filtro (whatmann N°1 de 4mm), se colocaron los discos sobre placas con medio TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sucrosa, selectivo para vibrios), previamente inoculadas con cada bacteria; seguidamente se incubó a 28°C por 24h. Se registraron las zonas de inhibición, para los patógenos bacterianos y se expresó en mm. También se incluyó un control y tres repeticiones por cada especie de *Vibrio* ensayado.

En el Anexo 8 se halla el flujograma para los Halos de Inhibición de *Vibrio spp.*.

V.4.4. Manejo de residuos de cultivos y material infectado, medidas de seguridad en el laboratorio.

Se tomaron en cuenta los cuidados necesarios para evitar algún tipo de contaminación dentro del laboratorio.

El material plástico utilizado (placas Petri, pipetas de 1 y 10ml) y filtros de papel, utilizados en los ensayos con *Vibrio spp.*, se almacenaron en una bolsa especial para autoclave y se esterilizaron durante 15 minutos antes de ser desechados.

Los materiales de vidrio (matraces, tubos de cultivo, y sistemas de filtración), se esterilizaron después de cada muestreo y una vez concluido el experimento, así mismo se lavaron y se volvieron a esterilizar antes de ser utilizados.

V.5 Análisis Estadístico

Para efectuar los análisis estadísticos se tomaron en consideración las hipótesis que fundamentan estas pruebas y que son la normalidad, la homogeneidad de varianzas y la independencia, así mismo se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para evaluar el efecto inhibitorio de la microalga sobre el crecimiento de cada una de las especies de *Vibrio*. De encontrarse diferencia significativa entre los tratamientos se procedió a realizar una prueba de Tukey, con la que se estableció las posibles diferencias entre los tratamientos.

Adicionalmente se aplicó una prueba de *t-Student* para verificar el cambio de la concentración de bacterias tipo *Vibrio* al momento de la inoculación y al tiempo en el que se presentó el 90% de inhibición de la misma (Molina-Cárdenas, 2011).

Los datos de los muestreos efectuados se analizaron con el programa estadístico IBM SPSS Statistics (Versión 22) y se consideró un valor de significancia de 0.05.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el proceso de ensayo, de las cuatro especies de bacterias propuestas para la presente investigación, *Vibrio alginolyticus*, *V. furnisii*, *V. splendidus*, y *V. parahaemolyticus*, sólo se llegó a realizar los ensayos con *V. furnisii*, ya que a pesar de haber realizado procesos repetidos de enriquecimiento (Anexo 9), para recuperar las otras tres especies, no se llegó a alcanzar la fase cultivable de las mismas. Cabe señalar que los vibrios en la naturaleza también pueden estar en un estado inactivo o no ser capaces de crecer en los medios selectivos empleados (Colwell & Grimes 2000), siendo bacterias en estado de viables no cultivables (VBNC) (Colwell 2000).

VI.1. Crecimiento de *Isochrysis galbana* en cultivo axénico.

Se evaluó la tasa de crecimiento de *Isochrysis galbana* IMP-BG 010, en tres repeticiones (RA, RB y RC) en cultivos estáticos (sin recambio de medio y sin aireación), a una temperatura de 26°C y con irradiancia continua de luz blanca. Alcanzaron densidades de $1,4 \times 10^7$ células/ml, $1,4 \times 10^7$ células/ml y $1,3 \times 10^7$ células/ml respectivamente (Fig. 4). En la figura 5 se observa que éstas repeticiones no presentan diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre sí con respecto al crecimiento de la microalga (ANOVA F=0.2).

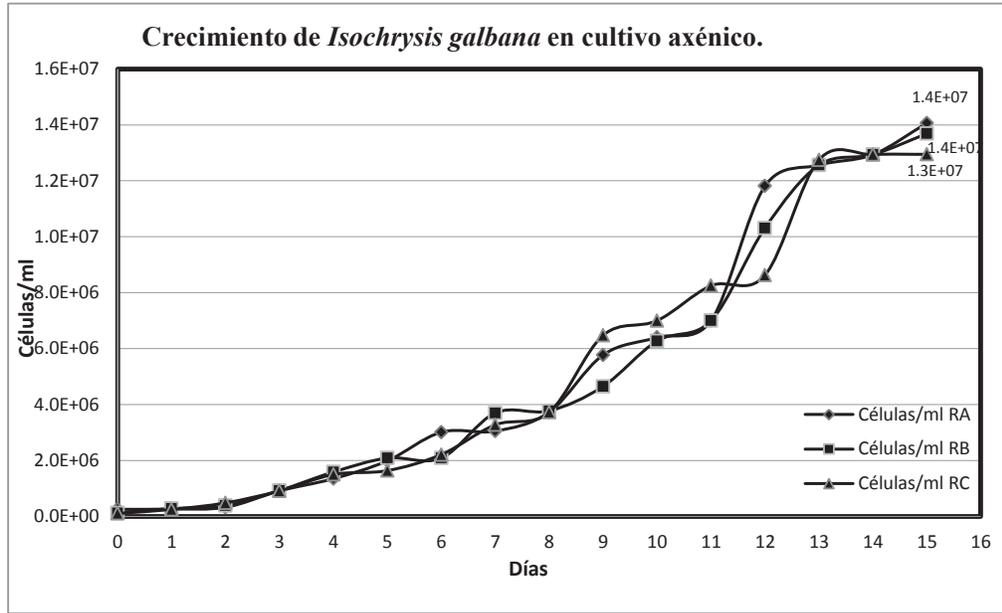


Figura 4: Valores promedio de la densidad celular de *Isochrysis galbana* IMP-BG 010, en tres repeticiones RA (◆), RB (■) y RC (▲), mantenidas en cultivos estáticos y bajo las mismas condiciones de temperatura e iluminación.

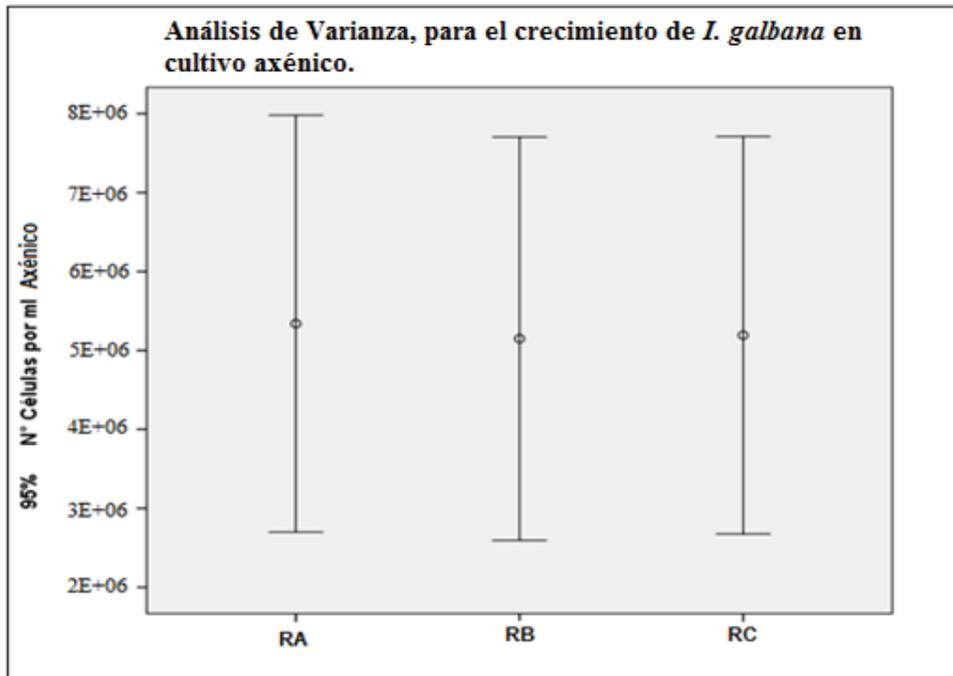


Figura 5: Análisis de varianza, para el crecimiento de *Isochrysis galbana* IMP-BG 010, en tres repeticiones (RA, RB y RC), mantenidas en cultivos estáticos y bajo las mismas condiciones de temperatura e iluminación.

Así mismo se determinó la tasa de crecimiento de la microalga (Cuadro 1), no existiendo diferencia significativa entre las tasas de crecimiento de las tres repeticiones ($\alpha=0.05$).

Cuadro 1: Tasa de crecimiento de *Isochrysis galbana* IMP-BG-010 en cultivo axénico, en tres repeticiones (RA, RB y RC), mantenidas en cultivos estáticos y bajo las mismas condiciones de temperatura e iluminación.

Tasa de Crecimiento de <i>I. galbana</i>			
Día	RA	RB	RC
0	-	-	-
1	0.04	1.16	1.20
2	0.31	0.45	0.97
3	1.48	1.27	0.92
4	0.57	0.78	0.72
5	0.56	0.40	0.13
6	0.60	0.00	0.43
7	0.02	0.83	0.57
8	0.29	0.03	0.19
9	0.63	0.30	0.80
10	0.15	0.43	0.11
11	0.13	0.16	0.24
12	0.75	0.56	0.06
13	0.09	0.28	0.56
14	0.04	0.04	0.02
15	0.12	0.08	0.00

VI.2. Crecimiento de *Isochrysis galbana* en cultivo mixto (microalga – bacteria)

Se evaluó la tasa de crecimiento de *Isochrysis galbana* IMP-BG 010 en presencia de *Vibrio furnisii* (cultivo mixto), en tres repeticiones (RA, RB y RC) en cultivos estáticos (sin recambio de medio y sin aireación), iluminados con lámparas fluorescentes a una irradiancia continua a una temperatura de 26°C. Alcanzaron densidades de $3,1 \times 10^7$ células/ml, $3,6 \times 10^7$ células/ml y $3,5 \times 10^7$ células/ml respectivamente (Fig. 6). En la figura 7 se observa que éstas repeticiones no presentan diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre sí con respecto al crecimiento de la microalga (ANOVA F= 0.007).

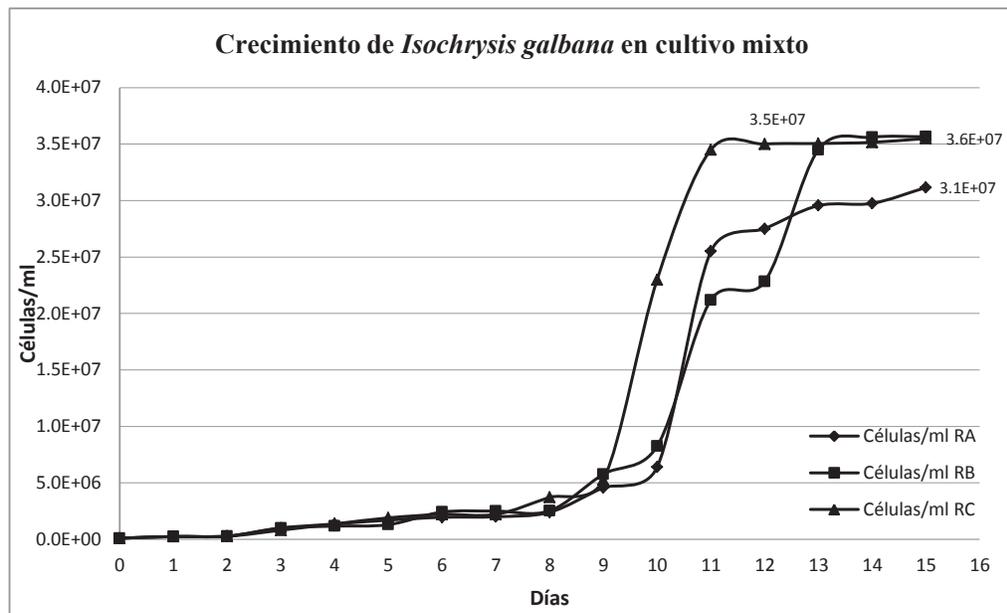


Figura 6: Valores promedio de la densidad celular de *Isochrysis galbana* IMP-BG 010 en presencia de *Vibrio furnisii*, en tres repeticiones RA (◆), RB (■) y RC (▲), mantenidas en cultivos estáticos y bajo las mismas condiciones de temperatura e iluminación.

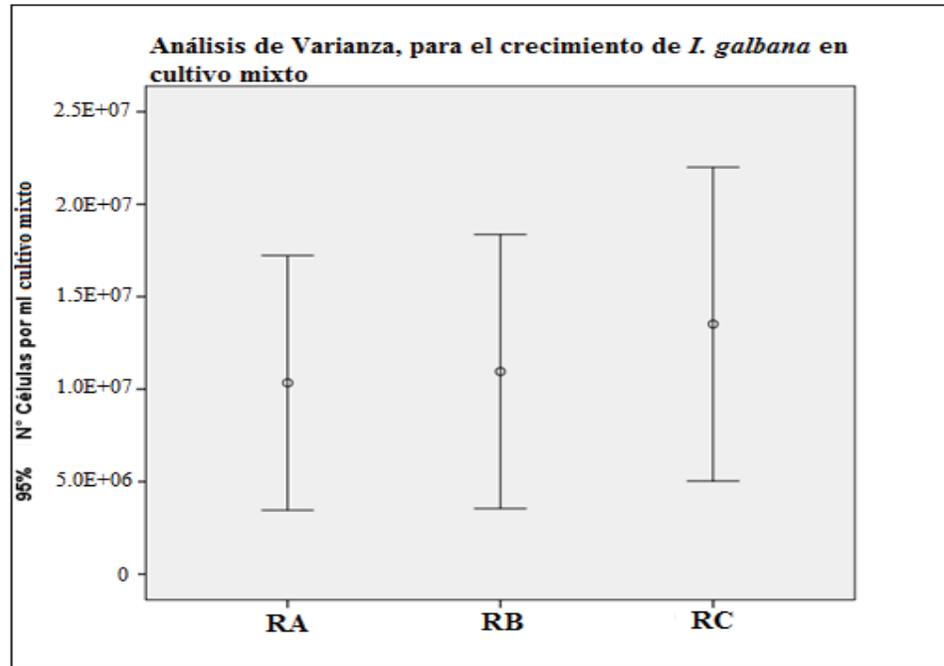


Figura 7: Análisis de varianza, para el crecimiento de *Isochrysis galbana* IMP-BG 010 en presencia de *Vibrio furnisii*, en tres repeticiones (RA, RB y RC), mantenidas en cultivos estáticos y bajo las mismas condiciones de temperatura e iluminación

Así mismo se determinó la tasa de crecimiento de la microalga en presencia de la bacteria (Cuadro 2), no existiendo diferencia significativa entre las tasas de crecimiento de las tres repeticiones ($\alpha=0.05$)

Cuadro 2: Tasa de crecimiento de *Isochrysis galbana* IMP-BG 010 en presencia de *Vibrio furnisii* en tres repeticiones (RA, RB y RC), mantenidas en cultivos estáticos y bajo las mismas condiciones de temperatura e iluminación.

Tasa de Crecimiento de <i>I. galbana</i> en presencia de <i>V. furnisii</i>			
Día	RA	R B	R C
0	-	-	-
1	1.28	1.27	1.34
2	0.21	0.21	0.10
3	1.84	1.84	1.58
4	0.44	0.22	0.75
5	0.32	0.16	0.48
6	0.20	0.89	0.22
7	0.04	0.05	0.00
8	0.26	0.01	0.75
9	0.93	1.19	0.50
10	0.48	0.51	2.13
11	1.99	1.36	0.58
12	0.11	0.11	0.02
13	0.10	0.60	0.00
14	0.01	0.05	0.00
15	0.07	0.00	0.01

VI.3 Diferencias de crecimiento de la microalga *I. galbana* entre cultivo axénico y cultivo mixto.

La densidad celular máxima (DCM) de la microalga en ambos tipos de cultivo, presenta una diferencia altamente significativa entre las varianzas de las mismas (Prueba de Levene, $F= 96,027$) respecto al crecimiento de la microalga. La microalga en cultivo axénico alcanza una DCM de $1,41 \times 10^7$ células/ml, mientras que su DCM en cultivo mixto es $3,57 \times 10^7$ células/ml. Observándose diferencias significativas con respecto al crecimiento. Las tasas de crecimiento varían significativamente ($t = 2,978$) con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ (Anexo 10).

Es importante conocer las tasa de crecimiento de la microalga así como la DCM que ésta alcanza en condiciones axénicas y en cultivo mixto para efectos de comparación entre ambos tratamientos. Se notifica la alta diferencia entre ambas DCM's lo que implica que el aporte bacteriano (*V. furnisii*) efectuado, acelera el crecimiento de la microalga y multiplica su densidad celular. Grossart (1999) demostró que en presencia de bacteria, el crecimiento del fitoplancton es significativamente mayor a los cultivos axénicos, llegando hasta a duplicar el número de células, inclusive la actividad microbiana en agregados y detritos puede conducir a la liberación de amonio, nitrato, fósforo y CO₂, incrementando y manteniendo el crecimiento de los cultivos de microalga.

La añadidura de bacterias al cultivo facilitaría procesos más eficientes de intercambio de ciertos sustratos entre las bacterias que se adhieren a las células fitoplanctónicas, ya que la adhesión de las bacterias disminuye la distancia de difusión y se traduce en un intercambio más rápido de sustratos (Park *et al.*, 2008).

Se ha reportado evidencia en laboratorio de la existencia de la ficósfera, espacio en el que interactúan las microalgas y bacterias en forma inhibitoria o estimulante debido a la liberación de compuestos extracelulares como las vitaminas (Cole 1982; Croft *et al.*, 2005) y factores promotores o inhibidores del crecimiento (Baker *et al.*, 1978; Cole, 1982; Salvesen *et al.*, 2000; Riquelme y Avendaño, 2003)

Estas interacciones también fueron propuestas por Molisch (1937), denominando a éste mecanismo alelopatía, mediante el cual efectos perjudiciales o benéficos que ya sea directa o indirectamente el resultado de la acción de compuestos químicos (aleloquímicos) que, liberados por un organismo, ejercen su acción en otro

(Sampietro, s.f.). El mecanismo se presenta cuando los compuestos bioactivos son excretados por células vivas, son efectivos a concentraciones naturales y existe una compensación entre el efecto sobre un individuo y el esfuerzo del otro para producirlo (Van Rijssel *et al.*, 2008).

Las relaciones alelopáticas son especie-específico, juegan un rol importante en la competencia entre especies de fitoplancton, formación de afloramientos algales “blooms” y sucesiones estacionales entre especies de microalgas en ambientes naturales y en ensayos en laboratorio (Molina-Cárdenas, 2011; Maestrini y Bonin, 1981; Fukami *et al.*, 1997; Fistarol *et al.*, 2004).

VI.4 Inhibición del crecimiento de *Vibrio furnisii* en cultivos de *Isochrysis galbana* IMP-BG 010 (cultivo mixto)

En los filtrados de 1ml, el efecto inhibitorio de *I. galbana* sobre el crecimiento de *V. furnisii*, se presentó a partir de las 96 horas (día 4) del ensayo, durante la fase de crecimiento exponencial de la microalga (Fig 8). Al inicio del ensayo (0 horas), *post*-inoculación de *V. furnisii*, se registraron concentraciones superiores a 1×10^3 BTCBS/ml (BTCBS: bacterias que crecen en medio de cultivo TCBS), mientras que a las 96 horas se registraron concentraciones imperceptibles o menores a 1×10^{-1} BTCBS/ml. La inhibición total del *V. furnisii* se registró a partir de las 144 horas (día 6) del ensayo (Fig. 9)

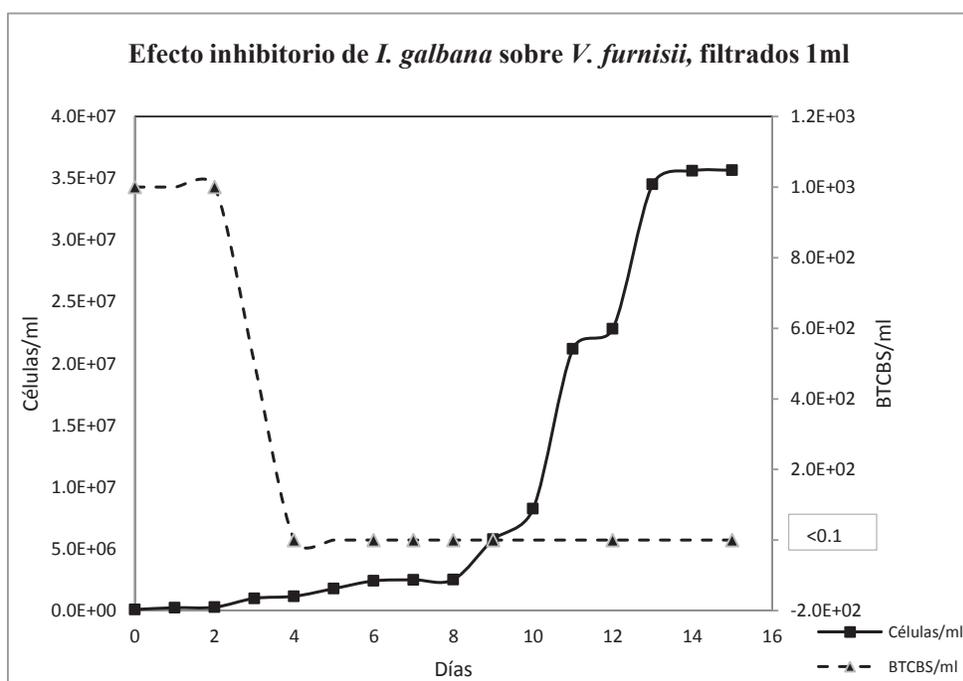


Figura 8: Valor promedio de la densidad de ▲ *V. furnisii* (BTCBS/ml) en cultivo mixto con ■ *I. galbana* (células/ml). Filtrados de 1ml.

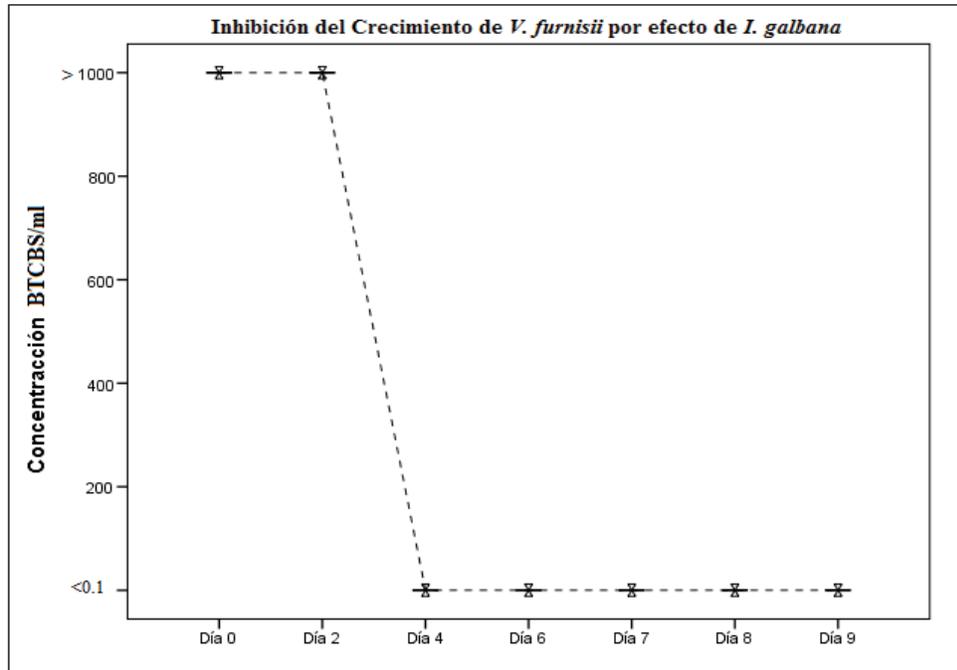


Figura 9: Valor promedio de la densidad de *V. furnisii* (BTCBS/ml) en cultivo mixto con *I. galbana*. Inhibición en el tiempo.

En los filtrados de 10 ml (BTCBS/10 ml) ocurre un comportamiento similar a los filtrados de 1ml. *Post* inoculación de bacteria, se registra concentraciones superiores 1×10^3 BTCBS/10ml, y a las 96 horas (día 4) del ensayo se registra la inhibición de crecimiento del *V. furnisii* (Fig. 10), contabilizándose 7 BTCBS/ 10ml y concentraciones menores a 1×10^{-1} BTCBS/ 10ml. La inhibición total se registró a partir de las 144 horas (día 6) del ensayo (Fig. 11)

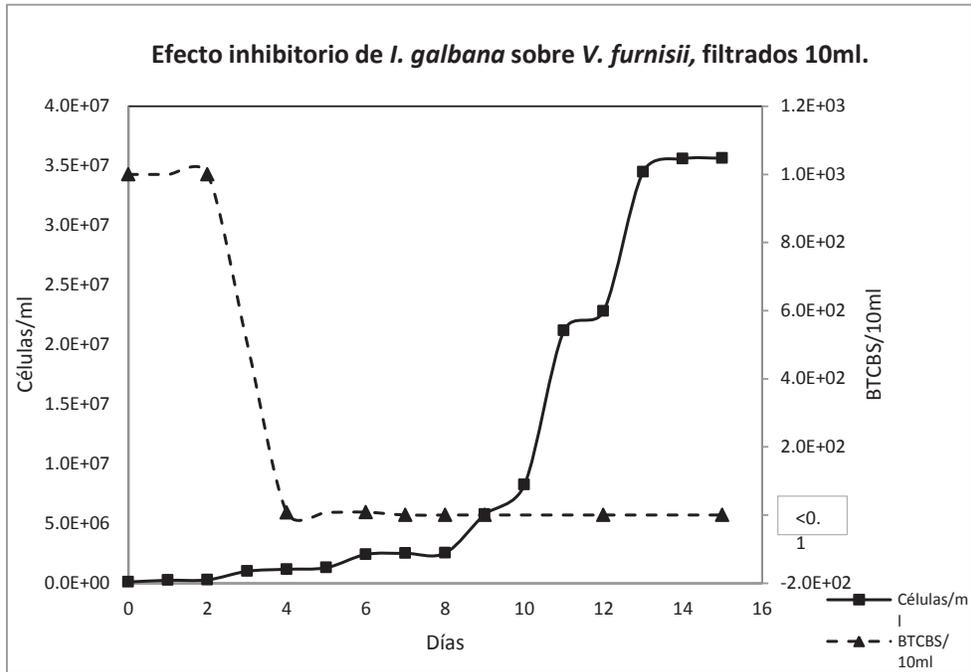


Figura 10: Valor promedio de la densidad de ▲ *V. furnisii* (BTCBS/10ml) en cultivo mixto con ■ *I. galbana* (células/ml). Filtrados de 10 ml.

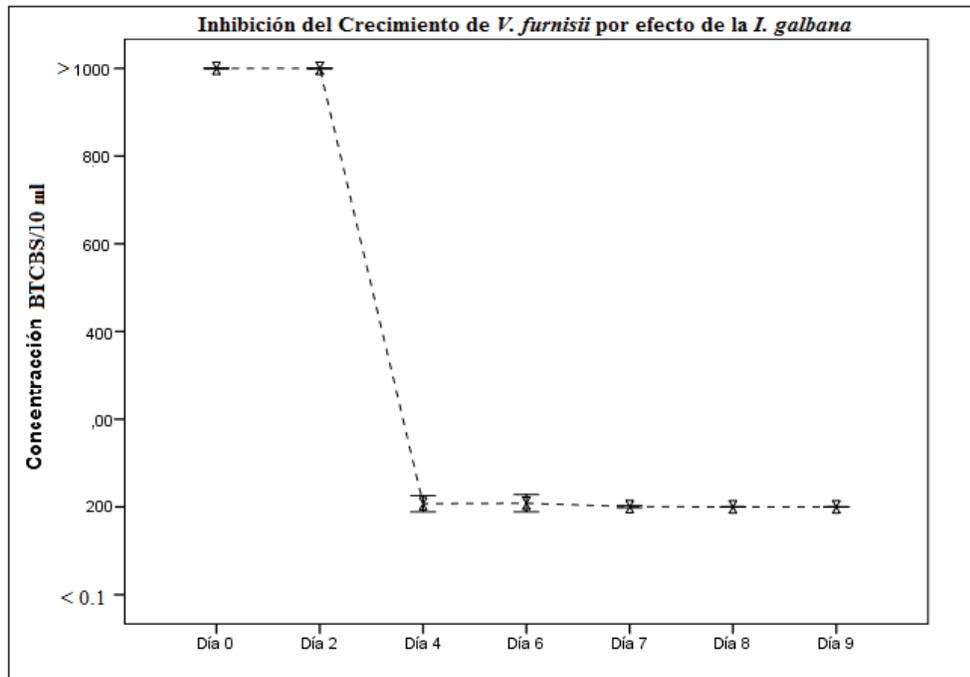


Figura 11: Valor promedio de la densidad de *V. furnisii* (BTCBS/ 10 ml) en cultivo mixto con *I. galbana*. Inhibición en el tiempo.

En ambos casos (1ml y 10ml), la inhibición se mantuvo hasta que la microalga alcanzó la fase estacionaria de su crecimiento. Encontrándose diferencias

altamente significativas ($F=41284,72$) entre las concentraciones al inicio del ensayo y al cuarto día del mismo ($\alpha=0.05$), observando más del 90% de inhibición (Cuadro 3). El análisis de inhibición se ve reforzado al observar los datos con los filtrados de 10ml, pues se concentra 10 veces más la muestra a evaluar.

Cuadro 3: Análisis de varianza de una vía, para el crecimiento de *V. furnisii* en cultivo mixto con *I. galbana* IMP-BG 010. Filtrados de 10ml.

ANOVA : BTCBS/10 ml					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4257398,290	6	709566,382	41284,720	,000
Dentro de grupos	240,620	14	17,187		
Total	4257638,910	20			

La *I. galbana* ejerce un efecto de inhibición sobre *V. furnisii*, se encontraron concentraciones indetectables, es decir no se observó crecimiento de colonias, lo cual corrobora los hallazgos realizados por otros investigadores, los cuales encontraron que la mayoría de algas marinas producen metabolitos secundarios con actividad biológica sobre el crecimiento de bacterias, hongos, virus y otros epibiontes (Duff, Bruce y Antia, 1966; Avendaño *et al.*, 1999, 2001; Liao *et al.*, 2003; Thillairajasekar *et al.*, 2009).

Así mismo, parámetros como: la tasa de crecimiento exponencial, densidad celular y fase de crecimiento pueden tener efectos sobre la actividad antibacteriana de una especie de microalga en particular (Sánchez-Saavedra *et al.*, 2010). En relación a lo anterior, otros investigadores hallaron que en etapas donde el crecimiento de la microalga es más lento (final de la fase exponencial e inicio de la fase estacionaria), se produce la mayor concentración de metabolitos orgánicos en comparación con la fase exponencial (Salvesen *et al.*, 2000; Skulberg, 2000; Terekhova *et al.*, 2009). No obstante en la presente investigación, la inhibición sobre *V. furnisii* se registró durante la fase exponencial de crecimiento de la microalga (Fig. 8 y 10) es decir cuando presentó las mayores tasas de crecimiento con valores de 1.84, 1.84 y 1.58 (Cuadro 2) en las tres repeticiones, lo cual indica que ésta bacteria es sensible a concentraciones de metabolitos liberados en dicha fase, en forma general se

afirma que la liberación de los metabolitos secundarios responsables de la inhibición del *V. furnisii* estaría determinado por la tasa de crecimiento de la microalga, a mayores tasas de crecimiento se favorecería la producción de metabolitos secundarios (Van Rijssel et al., 2008; Molina-Cárdenas, 2011).

Duff *et al.* en 1967, revelan que la investigación sobre *I. galbana* se centra en la caracterización de los productos responsables de la actividad antibacterial, la cual se atribuye tentativamente al efecto de dos componentes activos derivados de la chlorofila *a* y la feofitina *a.*, sin embargo investigaciones más recientes atribuyen la actividad antibacterial a la presencia de una mezcla de ácidos orgánicos tales como los ácidos oleico, cáprico, láurico, linoleico, mirístico, palmítico y esteárico (Salvador *et al.*, 2007; Manilal *et al.*, 2010). En este sentido cabe la posibilidad de que también los parámetros físico- químicos, como la presencia/ausencia de luz (fotoperiodo), salinidad del agua de mar, ejerzan un efecto sobre la producción de los metabolitos secundarios responsables de la inhibición bacteriana.

Así mismo, Salvesen *et al.* (2000), reportan que en el análisis de carga bacteriana de un cultivo que incluía la *I. galbana*, no se halló o hubieron bajos niveles de *Vibrio spp*, demostrando el efecto antibacterial que posee la *I. galbana* especialmente sobre bacterias del género *Vibrio*. De igual forma Molina-Cárdenas (2011), y Kokou *et al.* (2012) demostraron la actividad antibacterial de diferentes especies de microalgas sobre bacterias del género *Vibrio*, concluyendo que la *I. galbana* presentó la mayor actividad antibacterial sobre las bacterias en mención, comprobando así las observaciones de investigadores anteriores que señalaron actividad vibriocida de la microalga (Naviner *et al.*, 1999; Regunathan y Wesley, 2004).

El tiempo de inhibición encontrado para *V. furnisii* varía con los tiempos de inhibición para otros vibrios reportados por Molina-Cárdenas (2011) y Kokou (2012). Las diferencias de tiempo en relación con la inhibición se explica con el mecanismo de alelopatía y su característica de ser especie-específico, por lo que cada especie de bacteria puede presentar una tolerancia diferente a la presencia de un compuesto en particular (Molina-Cárdenas, 2011; Sánchez-Saavedra *et al.*,

2010) y a la producción de metabolitos secundarios de la *I. galbana*, que es altamente dependiente de las diversas condiciones bio-geográficas (Hay, 1996), por ende la capacidad de inhibición de la *I. galbana* sobre *Vibrio spp.* también se determina dada la cantidad y calidad de metabolitos que ésta libere, variando en función a las condiciones bio-geográficas de la misma.

VI.5. Halos de inhibición

Para determinar la presencia de metabolitos secundarios de *I. galbana* en los extractos microalgales, los que ofrecen propiedades antagónicas al crecimiento de *V. furnisii*, se realizó el análisis por HPLC (Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento) a 254 nm., con el extracto microalgal, el cual se obtuvo de un pellet de *I. galbana* de 0.1 gr de peso y cuyo solvente fue n-butanol. Como parámetro de control se usó el mismo solvente. La formación de picos en el cromatograma indican la presencia de metabolitos en el extracto microalgal (Fig. 12) (Guía de cromatografía, Universidad Central de Venezuela, 2008), observándose picos cromatográficos hasta el minuto 15 de la corrida (Tiempo de retención).

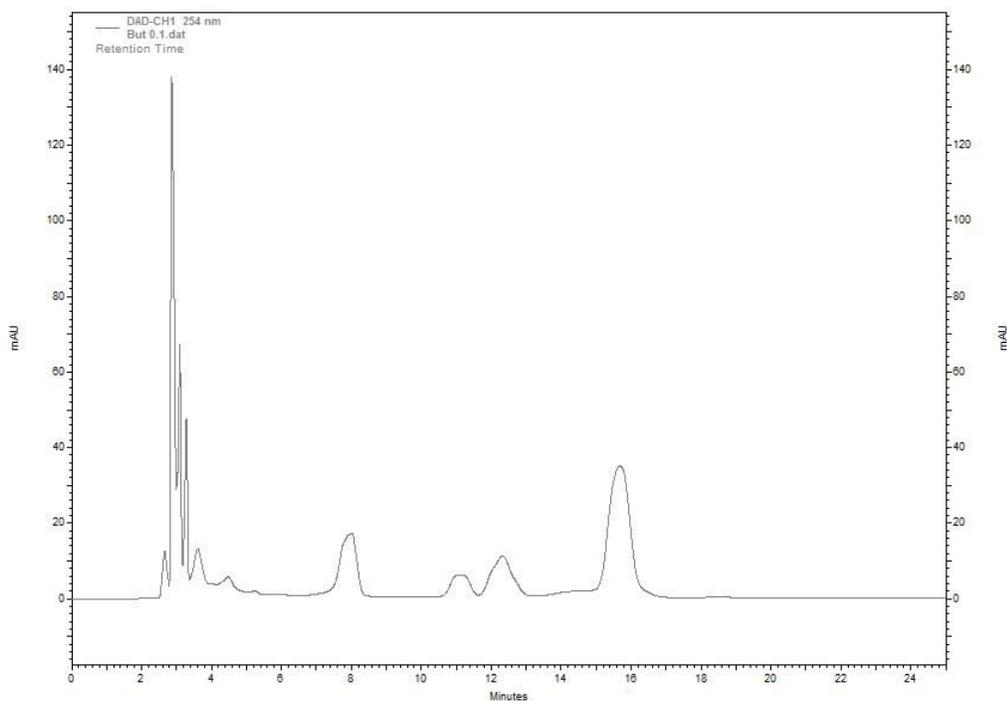


Figura 12: Cromatograma de extracto microalgal de *I. galbana* (0.1gr) con n-butanol a 254 nm.

Durante el proceso de la investigación, se replicó el procedimiento anterior, utilizando metanol como solvente y como parámetro de control. El análisis por HPLC se realizó a 254 nm. En la Fig. 13 observamos los picos cromatográficos que muestran la presencia de metabolitos en el extracto microalgal, los picos se observan hasta el minuto 20 de la corrida.

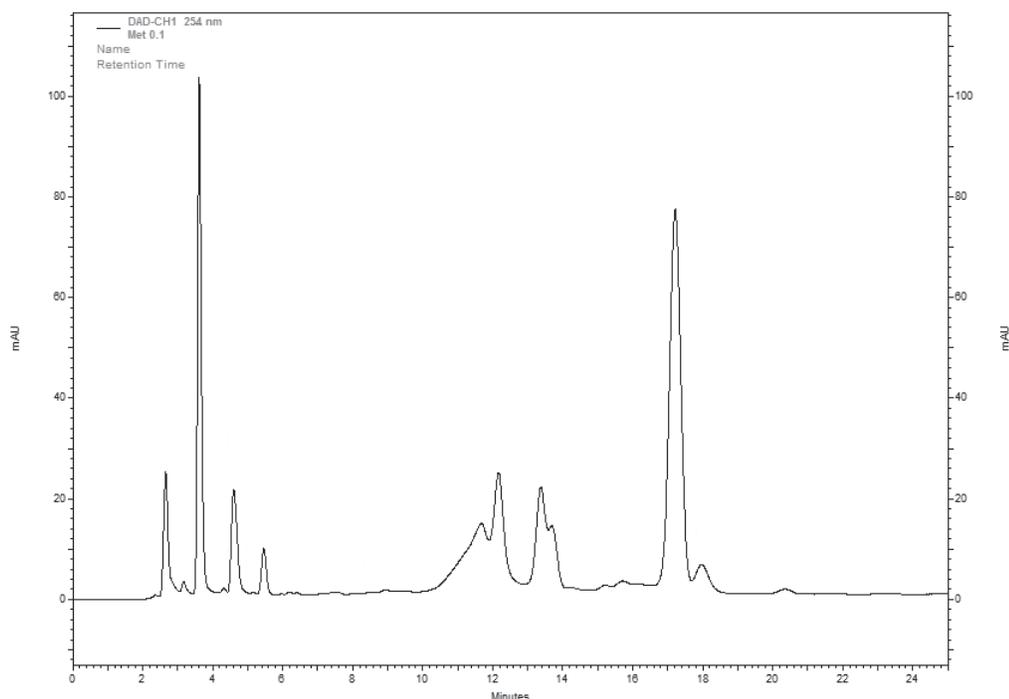


Figura 13: Cromatograma de extracto microalgal de *I. galbana* (0.1gr) con metanol a 254 nm.

En ambos casos los picos, indican la presencia de compuestos extraídos por los solventes empleados. Por simple inspección de los cromatogramas el solvente que permite la mayor extracción de metabolitos secundarios es el metanol (fig. 13), comprobando el hallazgo por Desbois *et al.* (2008).

Se obtuvo extractos microalgales con n-butanol y metanol (solventes) y con 0.1gr y 0.5 gr de pellet microalgal (*I. galbana*). Los extractos microalgales se utilizaron para efectuar el test de sensibilidad, se impregnaron los discos de sensibilidad con cada uno de los extractos microalgales, como parámetro de control se utilizó n-butanol y metanol Así mismo, las placas Petri con medio de cultivo TCBS (selectivo para *Vibrio spp.*) fueron inoculadas con *V. furnisii* en suero fisiológico a la concentración de 1×10^5 BTCBS/ml (por difusión con una espátula de Dragasky). Los discos de sensibilidad previamente impregnados con los extractos microalgales y con los controles se colocaron en las placas Petri inoculadas con *V. furnisii* y se incubó a 28°C durante 24 horas. Las lecturas de los halos de inhibición se realizaron en mm..

El test de sensibilidad que se realizó con extracto microalgal usando n-butanol (solvente), presentó halos pequeños, los mismos que se diferenciaron en tamaño

entre aquellos extractos microalgales obtenidos con 0.1gr y 0.5gr de pellet respectivamente. Las medidas de los halos en las fotografías son: a = 0.4mm y b=0.5mm (Fig. 14), *V. furnisii* es resistente al extracto microalgal con n-butanol.

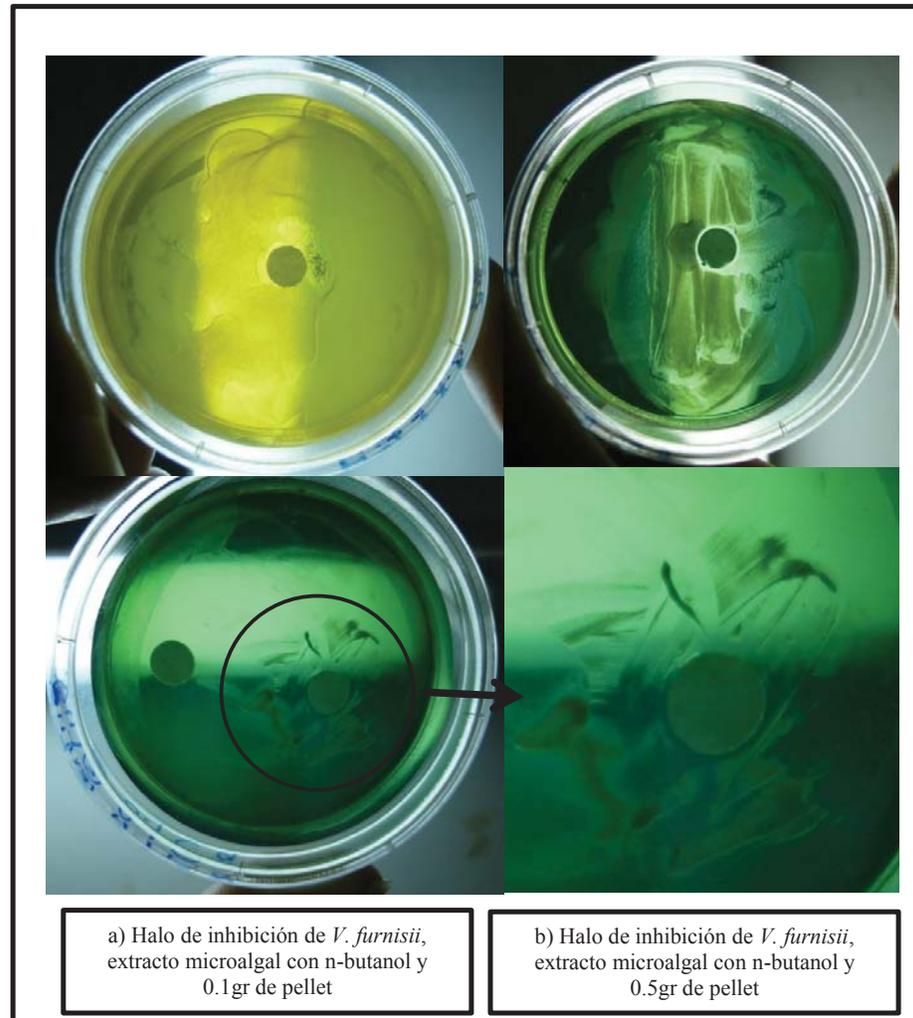


Figura 14: Halo de inhibición de *V. furnisii*, extracto microalgal de *I. galbana* con n-butanol y 0.1gr de pellet (a) y 0.5gr de pellet (b).

El test de sensibilidad con extracto microalgal usando **metanol** (solvente), registró halos de inhibición más grandes para *V. furnisii*, se halló un mayor halo de inhibición para los extractos procedentes de 0.5gr de pellet de microalga (mayor concentración) en diferencia al de 0.1gr (menor concentración).



Figura 15: Halo de inhibición de *V. furnisii*, extracto microalgal de *I. galbana* con metanol y 0.1gr de pellet (a) y 0.5gr de pellet (b).

Las medidas de los halos de inhibición en la figura 15 son: a = 0.7mm y b= 11mm, el extracto microalgal con metanol y 0.5gr de pellet (*I. galbana*), tiene capacidad inhibitoria (antibacterial) sobre el crecimiento de *V. furnisii* (Fig. 15 b), así mismo *V. furnisii* es sensible al extracto microalgal anteriormente mencionado. La fuerza del principio activo depende de la utilización de un solvente adecuado para extraer los metabolitos secundarios, por lo tanto, debido a sus posibles acciones anti patógenas, hay un rol importante para las microalgas marinas en el control de bacterias patógenas (Lazarus y Bhimba, 2008).

Los parámetros de control n-butanol y metanol, no generaron ningún halo de inhibición en la placa (Fig. 16).

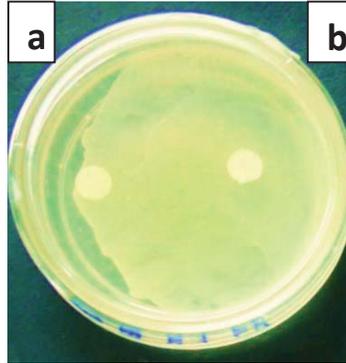


Figura 16: Parámetros de control en el test de sensibilidad de *V. furnisii*, metanol (a) y n-butanol (b).

VI.6. Evaluación del Crecimiento de *Vibrio spp*

Para evaluar el crecimiento de *V. furnisii* sin intervención de la microalga y sus metabolitos respectivos, se inoculó la bacteria (concentración inicial 10^2 UFC/ml) en agua de mar enriquecida con medio f2, el crecimiento se analizó a través de filtrados efectuados a las 0, 48, 96, 168 horas post-inoculación de la bacteria, hasta que la población bacteriana alcanzó el tiempo paralelo a la fase estacionaria del crecimiento de la microalga (Fig. 17). Se incubó en medio TCBS a 28°C durante 24 horas.

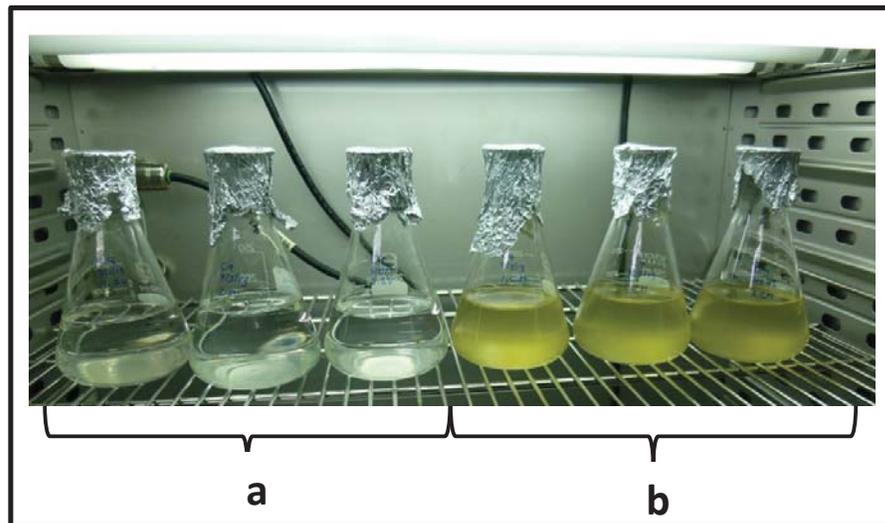


Figura 17: a) Cultivo de *V. furnisii* en agua de mar enriquecida con medio f2, b) Cultivo mixto de *V. furnisii* e *I. galbana* en agua de mar enriquecida con medio f2

Los conteos a 24 horas post-inoculación muestran concentraciones mayores a 10^3 BTCBS/ml en los filtrados de 1ml, de igual forma para los filtrados de 10ml se apreció concentraciones superiores a 10^3 BTCBS/10ml. (Fig. 18)

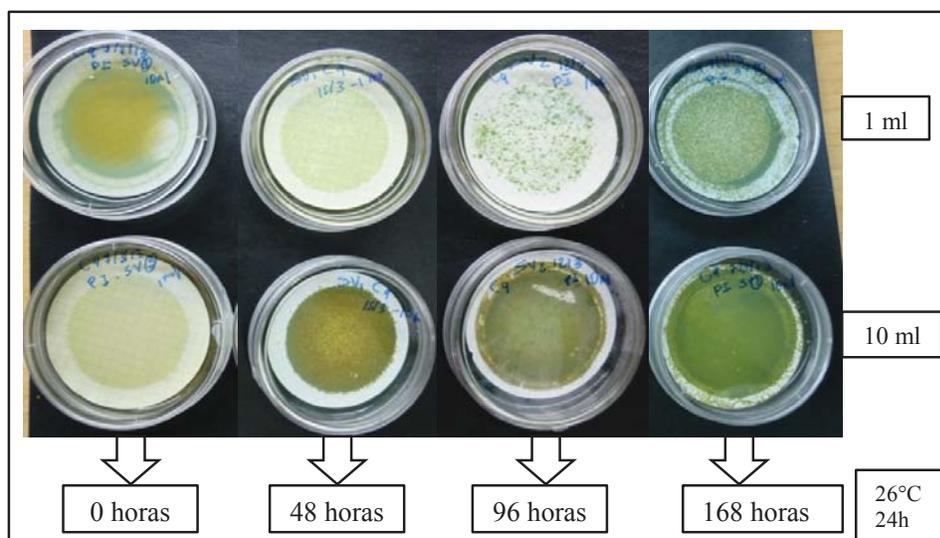


Figura 18: Crecimiento de *V. furnisii* (BTCBS/ml) en agua de mar enriquecida con medio f2, muestras a 0, 48, 96 y 168 horas *post*-inoculación de bacteria mediante filtrados de 1ml y 10ml.

El incremento de la concentración de *V. furnisii* en el tiempo (0,48, 96, 168 horas), es observado en las placas Petri en filtrados de 1y 10ml (Fig.18), en consecuencia se afirma que el crecimiento de *V. furnisii* va en aumento en relación al tiempo en el cultivo de la bacteria en agua de mar enriquecida con medio f2(Cuadro 4). Lo cual refuerza la hipótesis de que la inhibición del crecimiento de *V. furnisii* se da por el efecto de los metabolitos secundarios de la microalga *I. galbana*.

El comportamiento de la bacteria fue previsible, debido a que según sus características básicas, la bacteria es capaz de desarrollarse óptimamente en medio marino (Glenn Morris, 2003), y por ser mesófila la temperatura suministrada (28°C) también propició un crecimiento adecuado. Así mismo la presencia de NaCl es propicio para su crecimiento (Thompson *et al.*, 2004; López-T. y Lizárraga, 2001).

Cuadro 4: Crecimiento de *Vibrio furnisii* en el tiempo, filtrados de 1ml y 10ml.

	BTCBS/ml	BTCBS/10ml
	1ml	10ml
0 HORAS	> 1×10^3	> 1×10^3
48 HORAS	> 1×10^3	> 1×10^3
96 HORAS	> 1×10^3	> 1×10^3
144 HORAS	> 1×10^3	> 1×10^3
168 HORAS	> 1×10^3	> 1×10^3
192 HORAS	> 1×10^3	> 1×10^3

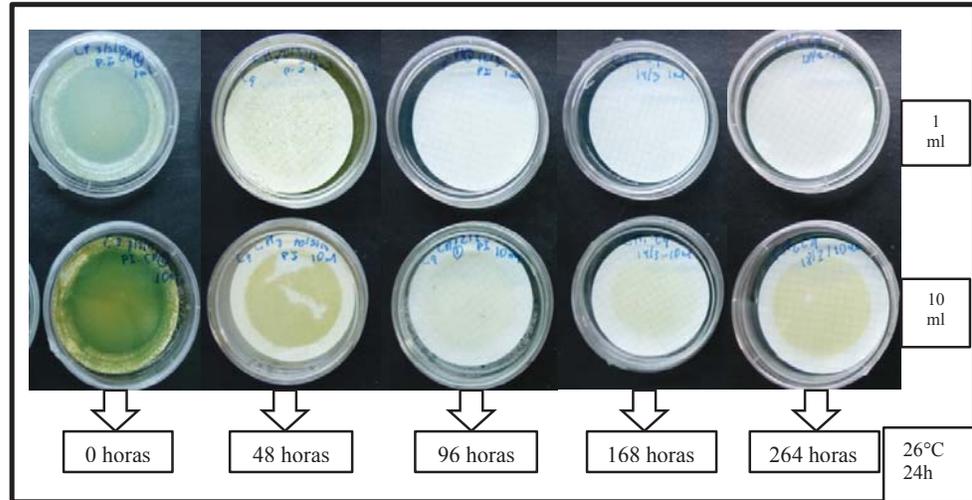


Figura 19: Crecimiento de *V. furnisii* (BTCBS/ml) en cultivo mixto (*I. galbana*) en agua de mar enriquecida con medio f2, muestros a 0, 48, 96, 168 y 264 horas *post*-inoculación de bacteria mediante filtrados de 1ml y 10ml.

VII. CONCLUSIONES

1. La adición de bacterias tipo *Vibrio* a un cultivo de *I. galbana*, incrementa el crecimiento de la microalga y la densidad celular máxima (DCM) que ésta alcanza en relación a un cultivo axénico, llegando casi hasta triplicar la DCM en cultivo mixto (microalga – bacteria)
2. Un factor importante dentro del proceso de inhibición, es la influencia de las etapas de crecimiento de la *I. galbana* y consecuentemente la liberación de los productos antibacteriales, los mismos que varían en cantidad de acuerdo a cada fase de crecimiento de la microalga.
3. La inhibición del *V. furnisii* se presentó en la fase exponencial de crecimiento de la microalga, y se mantuvo hasta cuando la microalga alcanzó la fase estacionaria de su crecimiento.
4. Los aleloquímicos liberados por la microalga *I. galbana* ejercen un efecto inhibitorio directo sobre el crecimiento de *V. furnisii*. Se comprobó la selectividad y efectividad de la microalga *I. galbana* sobre la inhibición del crecimiento de *V. furnisii*.
5. El n-butanol permite la extracción de metabolitos secundarios de la microalga, sin embargo metanol, como solvente, permite la mayor extracción de compuestos activos y/o secundarios de la *I. galbana*. Concluyendo que el metanol permite una mayor extracción.
6. *V. furnisii* es más sensible al extracto microalgal con metanol, el principio activo de inhibición se elucida mejor utilizando el metanol como solvente, por lo tanto el metanol es un solvente adecuado para la obtención de extractos microalgales de *I. galbana*.
7. En relación al metabolismo del *Vibrio*, éste no se ve afectado si sólo se cultiva en agua de mar enriquecida (medio f2).

VIII. RECOMENDACIONES

Profundizar el análisis por HPLC del extracto microalgal de *I. galbana*, para la identificación química del compuesto responsable de la actividad antimicrobiana. Así mismo investigar sobre el proceso de inhibición y acción del compuesto identificado. Podría brindarse una solución a las bacteriosis causadas por *Vibrio spp.* en organismos de interés en la acuicultura.

Realizar más estudios para determinar la capacidad inhibitoria de la *I. galbana* sobre otras bacterias tipo *Vibrio*. Seleccionar las especies de *Vibrio spp.* a estudiar de acuerdo al rango de salinidad óptimos (concentración salina a la cual la bacteria presenta una adecuada tasa de crecimiento y desarrollo) de los vibrios seleccionados, debido a que el desarrollo de cada especie de *Vibrio* está determinado también por la salinidad del medio; efectuar estudios diferenciados de la capacidad inhibitoria de *I. galbana* en presencia y ausencia de luz (fotoperiodo).

Llevar a cabo el test de sensibilidad utilizando el medio f2 (medio de cultivo de microalgas) en el cual se mantuvo en crecimiento la *I. galbana* al alcanzar la fase estacionaria de su crecimiento. Efectuar estudios para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos microalgales de *I. galbana* respecto a sensibilidad sobre *Vibrio spp.*

Profundizar la investigación para repetir el ensayo in vivo, en bioreactores que simulen condiciones de un sistema acuícola, que permita identificar el mecanismo de acción de la *I. galbana* y su inhibición sobre bacterias patógenas, especialmente sobre *Vibrio spp.*

Incrementar el suministro de *I. galbana* en los hatcheries de organismos cultivados (acuicultura), para prevenir y/o mitigar las vibriosis.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albentosa, M.; Pérez-Camacho, A.; Labarta, U.; Fernández-Reiriz, M.J.. 1996. Evaluation of live microalgal diets for the seed culture of *Ruditapes decussatus* using physiological and biochemical parameters. *Aquaculture* Vol. 148, Issue 1, Págs. 11-23.
2. Aliaga, R.; Miranda, J.; Zevallos, J.. 2010. Aislamiento e identificación de *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 en pescados y moluscos bivalvos procedentes de un mercado pesquero de Lima, Perú. *RevMedHered* 21, 2010 145.
3. Arias, C. R., E. Garay, and R. Aznar. 1995. Nested PCR method for rapid and sensitive detection of *Vibrio vulnificus* in fish, sediments, and water. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3476–3478.
4. Austin, B., and Austin, D. A.. 1999. *Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish*, 3rd ed. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.
5. Austin, B.; Pride, A. C. and Rhodie, G. A.. 2003. Association of a bacteriophage with virulence in *Vibrio harveyi*. *J. Fish Dis.* 26:55–58.
6. Avendaño, R.E.; Riquelme, C.E.. 1999. Establishment of Mixed-culture Probiotics and Algae as Food for Bivalve Larvae. *Aquaculture Research* 30: 893-900.
7. Avendaño, R.E.; Dekovic, M.; Riquelme, C.E.. 2001. Establecimiento de bacterias benéficas en el tracto digestivo y gónada de adultos de *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) en cultivo masivo. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 36 (1): 31– 41
8. Baker, K.H y Herson, D.S. 1978. Interactions between the diatom *Thalassiosira pseudonanna* and associated pseudomonas in mariculture systems. *Applied and Environmental Microbiology* 35(4):791-796.
9. Balakrish N., G.; Bhadra, R.K.; Ramamurthy, T.; Ramesh, A.; Pal, S.C. 1991. *Vibrio cholerae* and other vibrios associated with paddy field cultured prawns. *Food Microbiology.* Vol. 8, Issue 3, Págs. 203–208.
10. Balakrish N., G.; Ramamurthy, T.; Bhattacharya, S.K.; Dutta, B.; Takeda, Y. and Sack, D.A.. 2007. Global Dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* Serotype O3:K6 and Its Serovariants. *Clinical Microbiology Reviews*, p. 39-48.
11. Bastidas, O.. (s.f). Technical Note, Neubauer Chamber Cell Counting. Celeromics

12. Beaz-Hidalgo, R.; Balboa, S.; Romalde, J.L. and Figueras, M.J.. 2010. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs Environmental Microbiology Reports 2(1), 34–43.
13. Blake, P.A.; Weaver, R.E.; Hollis. 1980. Diseases of humans (other than cholerae) caused by vibrios. Ann Rev Microbiol 34: 341-67.
14. Borrego, J. J.; Castro, D.; Luque, A.; Paillard, C.; Maes, P.; Garcia, M. T. and Ventosa, A..1996. *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. Int. J. Syst. Bacteriol. 46:480–484.
15. Carvajal U., C.A.; Araya A., A.A.; Pérez E., E.P.; Briceño T., L.A.; Hernández C., R. y Madrigal V, M.A. (s.f.). Utilización de Microalgas Aisladas del Medio Ambiente Natural para el Enriquecimiento de Dietas para Larvas de Ostión del Norte (*Argopecten purpuratus*). Algas Chañar.
16. Cole, J.J. 1982. Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. Annual Reviews Ecology Systems 13:291-314.
17. Colwell, R. R. 2000. Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. J. Infect. Chemother. 6:121-125.
18. Colwell, R. R., and D. J. Grimes. 2000. Nonculturable microorganisms in the environment. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
19. Colwell, R.R. and Patz, J. A.. 1998. Climate, Infectious Disease and Health An Interdisciplinary Perspective. American Academy of Microbiology. Colloquium held June 20–22, 1997, in Montego Bay, JM.
20. Colwell, R.R.1996. Global climate and infectious disease: The cholera paradigm. Science 274: 2025-31.
21. Conferencia Shrimp 2001. Cultivo sostenible de camarón: mitos y realidades, George Chamberlain - Global Aquaculture Alliance. Chennai, India.
22. Croft, M.T., Lawrence, A.D., Raux-Deery, E., Warren, J.M y Smith, A.G. 2005. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. Nature 438:90-93.
23. DeLoney-Marino, C. R., A. J. Wolfe, and K. L. Visick. 2003. Chemoattraction of *Vibrio fischeri* to serine, nucleosides, and N-acetylneuraminic acid, a component of squid light-organ mucus. Appl. Environ. Microbiol. 69:7527–7530.
24. DePaola, A, Kaysner, CA. 2004. Bacteriological Analytical Manual (BAM), Capítulo 9 *Vibrio*. Edition 8th, Revision A /1998.

25. Department of Microbiology, University of B. C., Vancouver, British Columbia and Antia, NJ (1967). The Identification of Two Antibacterial Products of marine Planktonic alga *Isochrysis galbana*
26. Desenvolvimiento del Comercio Exterior Pesquero, PromPerú. 2013. Lima, Perú. (en línea) Fecha de consulta: 06 de Julio de 2014.
27. Desbois, A. P.; Lebl, T.; Liming-Yan; Smith, V. J..2008. Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricorutum*. Appl Microbiol Biotechnol (2008) 81:755–764
28. Duff, DCB, Bruce, DL & Antia, NJ (1966) The antibacterial activity of marine planktonic algae. PlantPhysiol.
29. Fistarol, G.O., Legrand, C., Selander, E., Hummert, C., Stolte, W. y Granéli, E. 2004. Allelopathy in *Alexandrium spp.*: effect on a natural plankton community and on algal monocultures. Aquatic Microbial Ecology 35:45-56.
30. Fogg, G.E. y Thake, B.J. 1978. Algal Cultures and Phytoplankton Ecology. University of Wisconsin Press, London. 269 pp.
31. Fukami, K., Nishijima, T. y Ishida Y. 1997. Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. Hydrobiologia 358:185-191.
32. Gavilán, R.G.; Martínez-Urtaza, J.. 2011. Factores Ambientales Vinculados con la Aparición y Dispersión de las Epidemias de *Vibrio* en América del Sur. RevPeruMedExp Salud Publica. 2011; 28(1): 109-15.
33. Gil, A.I.; Lanata, C.F.; Miranda, H.; Prada, A.; Seas, C. Hall, E.R.; Meza, Rina; Barrero, C.M.; Maúrtua, D.; Balakrish N., G.. 2007. Gravedad de la Gastroenteritis causada por *Vibrio parahaemolyticus* del Grupo Pandémico en el Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 24 (4): 350-55.
34. Glenn Morris, J.. 2003. Cholera and Other Types of Vibriosis: A Story of Human Pandemics and Oysters on the Half Shell. Food Safety.280 • CID 2003:37
35. Gomez-Gil, B., Roque, A.; Turnbull, J. F.; and Tron-Mayen, L.. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. Aquaculture 163:1–9
36. Grisez, L.; Reyniers, J.; Verdonck, L.; Swings, J. and Ollevier, F.. 1997. Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae from two hatcheries, during larval development. Aquaculture 155:387–399.

37. Grossart, H.P. 1999. Interactions between marine bacteria and axénica diatoms (*Cylindrotheca fusiformis*, *Nitzschia laevis* and *Thalassiosira weissflogii*) incubated under various conditions in the lab. *Aquatic Microbial Ecology* 19:1-11.
38. 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.
39. Hay, M.E. 1996. Marine chemical ecology: what's known and what's next? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 200: 103-134.
40. Hlady, W.G.; Klontz, K.C.1996. The epidemiology of *Vibrio cholera* infections in Florida, 1981-1983. *J Infec Dis* 173: 1176-83.(
41. Huys, L.; Dhert, P.; Robles, R.; Ollevier, F.; Sorgeloos, P. and Swings, J. 2001. Search for beneficial bacterial strains for turbot (*Scophthalmus maximus L.*) larviculture. *Aquaculture* 193:25–37.
42. Ibarra, J.; Delgado, A. y Alvarado, D.. 1999. Vibrios no Epidémicos y *Vibrio cholerae* O1 Asociados a Enfermedad Diarreica Aguda. Evento Climatológico “El Niño” - 1998. Hospital Nacional Dos de Mayo. Anales de la Facultad de Medicina UNMSM. Vol. 60, N° 4. Págs. 251-256.
43. Kokou F., Makridis P., Kentouri M. and Divanach P.. 2012. Antibacterial Activity in Microalgae Cultures. *Aquaculture Research*, 2012, 43, 1520–1527.
44. Kaplan, D.; Cohen, Z. y Abeliovich, A..1986. Optimal Growth Conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass* 9: 37-48
45. Lai, H. T.; Hou, J.H.; Su, C.I.; Chen, C.L.. 2009. Effects of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chui*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72. 329– 334.
46. Lazarus .S and Bhimba V.. 2008. Antibacterial Activity of Marine Microalgae Against Multidrug Resistant Human Pathogens. *International Journal on Applied Bioengineering*. Vol.2, No.1.
47. Le-Roux, F.; Gay, M.; Lambert, C.; Nicolas, J.L.; Gouy, M.; Berthe, F.. 2004. Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. *Diseases of aquatic organisms* 58. 143-150.
48. Leyton, Y.; Riquelme, C.. 2008. Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43(3): 441-456.

49. Liao, W.R., Lin, J.Y., Shieh, W.Y. y Jeng, W.L. 2003. Antibiotic activity of lecithins from marine algae against marine vibrios. *Journal Indian Microbiology Biotechnology* 30: 433-439.
50. Lin, Y-H.; Chang, F-L; Tsao, C-Y; Leu, J-Y. 2007. Influence of growth phase and nutrient source on fatty acid composition of *Isochrysis galbana* CCMP 1324 in a batch photoreactor. *Biochemical Engineering Journal* 37: 166–176
51. Liu, C-P; Lin, L-P. 2001. Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis sp.* CCMP1324. *Bot. Bull. Acad. Sin* 42: 207-214.
52. Lizárraga P., M. L.; Montoya, R. L. y Gendrop, F. V. 1997. El uso de conteos bacterianos en dos criaderos mexicanos de camarón. *Ciencias Marinas* 23(1): 129-140.
53. López A, D; Sánchez P, JA; García S, JL; García C, F y Molina G, E. 1996. Solicitud de Patente N° 9500053. N° de Publicación ES 2 088 366 A1. 12 págs.
54. López-T, M.A.; Lizárraga P., M.L. 2001. Bacteria isolated on TCBS media associated with hatched *Artemia* cysts of commercial brands. *Aquaculture*, 194:11-20.
55. Lu, Z-Y; Zhu, W-M; Gu, Q-Q; Liu, M-X; Guo, J; Guan, H-S. 2007. Anti-Tumor Activity Screening Of Methanol Extracts Of Marine Microalgae In Vitro. *Oceanologia Et Limnologia Sinica* 2007-05.
56. Maestrini, S. Y. y Bonin, D.J. 1981. Allelopathic relationships between phytoplankton species. En: Platt, T. (ed.). *Physiological bases of phytoplankton ecology*. Canadian Bulletin Fisheries and Aquatic Sciences 210: 346 pp
57. Manilal, A.; Sujith, S.; Selvin, J.; Seghal-Kiran, G.; Shakir, C.; Premnath Lipton, A.. 2010. Antimicrobial potential of marine organisms collected from the southwest coast of India against multiresistant human and shrimp pathogens. *Scientia Marina* 74(2), 287-296. Barcelona (Spain)
58. McEwen, B.; Morel Kopp, M.C.; Tofler, G.; Ward, C.. 2010. Effect of Omega-3 Fish Oil on Cardiovascular Risk in Diabetes. *The Diabetes Educator* first published on June 9, 2010.
59. Merin, D.D.; Prakash, S.; Bhimba, B.V.. 2010. Antibacterial screening of silver nanoparticles synthesized by marine micro algae. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 797-799.

60. Molina-Cárdenas, CA. 2011. Efecto Inhibitorio de Diferentes Especies de Microalgas Sobre *Vibrio spp.*. Tesis Mag Sc. Ensenada, Baja California, MX. CICESE. 75p.
61. Molisch, H. 1937. Der Einfluss einer Pflanze auf die andere-Allelopathie. Fischer, Jena.
62. Naviner, M.; Bergé, J.-P.; Durand, P.; Le Bris, H..1999. Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. *Aquaculture* 174 . 15–24.
63. Nyholm, S.V.; Stabb, E.V.; Ruby E. G., and M. J. McFall-Ngai. 2000. Establishment of an animal-bacterial association: recruiting symbiotic *vibrios* from the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:10231–10235
64. Nyholm, S. V.; and M. J. McFall-Ngai. 2003. Dominance of *Vibrio fischeri* in secreted mucus outside the light organ of *Euprymna scolopes*: the first site of symbiont specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3932–3937
65. Park, Y., Je, K.-W., Lee, K., Jung, S.-E. y Choi, T.-J. 2008. Growth promotion of *Chlorella ellipsoidea* by co-inoculation with *Brevundimonas sp.* isolated from the microalga. *Hydrobiologia* 598:219-228.
66. Proceedings of 2010 3rd International Conference on Future BioMedical Information Engineering.2010, China. Antialgal Substances from *Isochrysis galbana* and Its Effects on The Growth of *Isochrysis galbana* and Six Species of Feed Microalgae (Vol. 2)
67. Regunathan, C.; Wesley, S.G.. 2004. Control of *Vibrio spp.* in shrimp hatcheries. using the green algae *Tetraselmis suecica*. *Asian Fish. Sci.*, 17: 147-158.
68. Riquelme, C.E., y Avedaño-Herrera, R.E. 2003. Interacción bacteria microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural* 76: 725-736.
69. Ringo, E.; and Birkbeck, T. H.. 1999. Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquacult. Res.* 30:73–93.
70. Rippey, S. 1994. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *ClinMicrobiol Rev* 7(4): 419-25
71. Rosenberg, E., and Y. Ben-Haim. 2002. Microbial diseases of corals and global warming. *Environ. Microbiol.* 4:318–326.
72. Sainz, J.C.; Maeda-Martínez, A.N. and Ascencio, F.. 1998. Experimental Vibriosis Induction with *Vibrio alginolyticus* of Larvae of the Catarina Scallop (

- Argopecten ventricosus =circularis*) (Sowerby II, 1842). Microbial Ecology .Vol35 , Number 2, 188-192.
73. Salvador, N., A; Gomez-Garreta, L.; Lavelli; L. Ribera. 2007. Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. Sci. Mar., 71: 101-113.
 74. Salvesen, I.; Reitan, K.I.; Skjermo, J.; Øie, G..2000. Microbial environments in marine larviculture:Impacts of algal growth rates on the bacterial load in six microalgae. Aquaculture International. Vol. 8, Issue 4, págs. 275-287.
 75. Sampietro, A. R.. (s.f.) Alelopatía: Concepto, características, metodología de estudio e importancia. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina.
 76. Sánchez-Saavedra, M., Licea-Navarro, A. y Bernáldez-Sarabia, J. 2010. Evaluation of the antibacterial activity of different species of phytoplankton. Revista de Biología Marina y Oceanografía 45(3):531-536.
 77. Sawabe, T.; Setogushi, N.; Inoue, S.; Tanaka, R.; Ootsubo, M.; Yoshimizu, M. and Ezura, Y.. 2003. Acetic acid production of *Vibrio halioticoli* from alginate: a possible role for establishment of abalone-*V. halioticoli* association. Aquaculture 219:671–679.
 78. Sharifah, E.; Eguchi, M. (s.f.)Benefits of live phytoplankton, *Chlorella vulgaris*, as a biocontrol agent against fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Fisheries Science 7 págs.
 79. Skulberg, O. M.. 2000. Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyte research. J. Appl. Phycol. 12: 341-348.
 80. Silva M., J. L.. 2012. Récord de Exportaciones 2011. (en línea) <http://www.siicex.gob.pe/siicex/resources/estudio/42409707radA4BC3.pdf> Fecha de consulta: 12 de febrero de 2012.
 81. Silva, A.. 1999. Efecto de la Microalga *Isochrysis galbana* en el Cultivo Temprano de *Paralichthys adpersus*. Ciencias Marinas Vol. 25 N° 002 : 267-276.
 82. Subrash, S.K.; Lipton, A.P.; Raj, R.P..2004. Antibiotic Exposure to Minimize Microbial Load in Live Feed *Isochrysis galbana* Used for Larval Rearing of Indian Pearl Oyster *Pinctada fucata*.Current Sciences. Vol. 87, N° 10.
 83. Tamayo, C.; Mullo, J.C. y Coautor Burgos, F.. (s.f.). Análisis comparativo de los halos de inhibición de dos probióticos comerciales en *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio parahaemoliticus*. Centro de Investigación Científica y Tecnológica. ESPOL

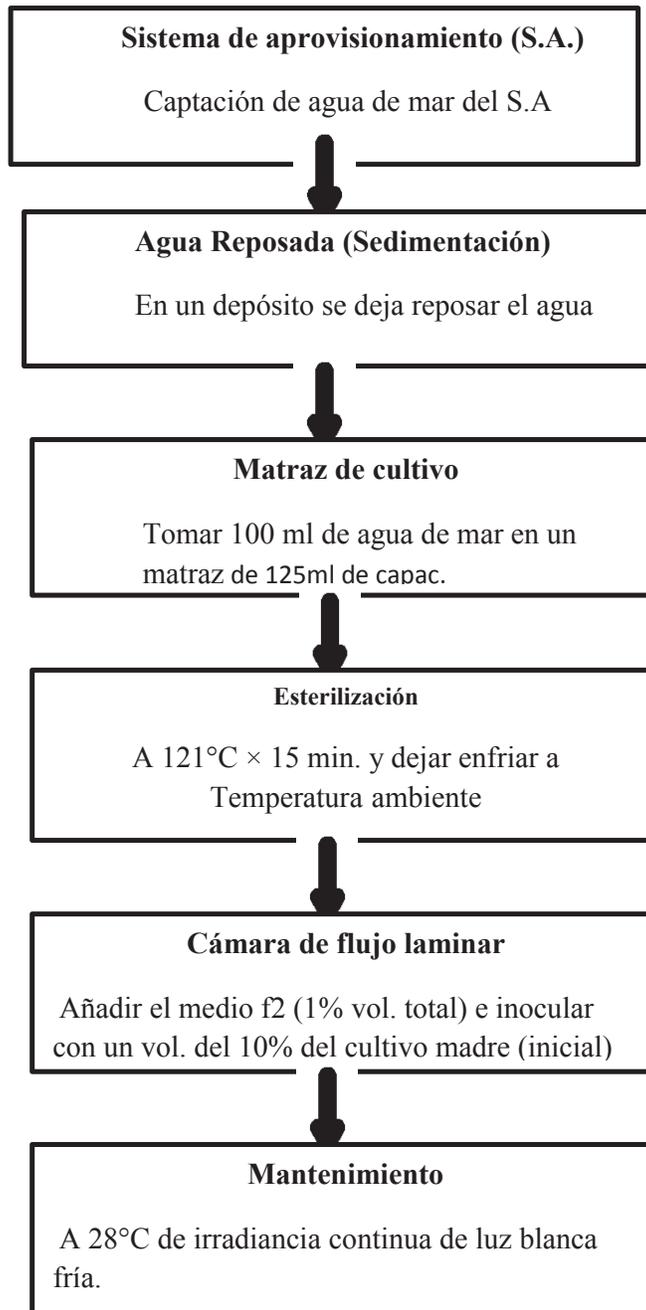
84. Terekhova, V.E., Aizdaicher, N.A., Buzoleva, L.S. y Somov, G.P. 2009. Influence of marine microalgae on the reproduction of the bacterium *Listeria monocytogenes*. Russian Journal of Marine Biology 35(4):355-358.
85. Thillairajasekar, K., Duraipandiyan, V., Perrumal, P. y Ignacimuthu, S. 2009. Antimicrobial activity of *Trichodesmium erythraeum* (Ehr) (microalgae) from South East coast of Tamil Nadu, India. International Journal of Integrative Biology 5(3): 167-170.
86. Thompson, F.L., Iida, T. y Swings, J. 2004. Biodiversity of Vibrios. Microbiology and Molecular Biology Reviews 68(3):403-431(20)
87. USDA (Department of Agriculture, US); ARS; Western Human Nutrition Research Center. 1993. Effects of Polyunsaturated Fats on Blood Pressure. Annu. Rev. Nutr. 13:243-60.
88. Vandenberghe, J.; Verdonck, L.; Robles-Arozarena, R.; Rivera, G.; Bolland, A.; Balladares, M.; Gomez-Gil, B.; Calderon, J.; Sorgeloos, P. and Swings, J.. 1999. Vibrios Associated with *Litopenaeus vannamei* Larvae, Postlarvae, Broodstock, and Hatchery Probiotics. Appl. Environ. Microbiol. 65(6):2592.
89. Van Rijssel, M., de Boer, M.K., Tyl, M.R. y Gieskes, W.W.C. 2008. Evidence for inhibition of bacterial luminescence by allele chemicals from *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae), and the role of light and microalgal growth rate. Hydrobiologia 596:289-299.
90. Venkateswara R., A.. (2009). Vibriosis en la acuicultura del camarón. [en línea] <http://www.bioaqualperu.com/VIBRIOSIS%20EN%20LA%20ACUICULTURA%20DEL%20CAMAR%C3%93N.doc.pdf> Fecha de consulta: 7 de febrero de 2012.
91. Hernández S., R.; Fernández, C., C.; Baptista, L., P.. 2010. Metodología de la Investigación. Mares, C., J.. Quinta edición. México D.F.. Mc Garw Hill. 613 págs.

X. ANEXOS

1. *Isochrysis galbana*

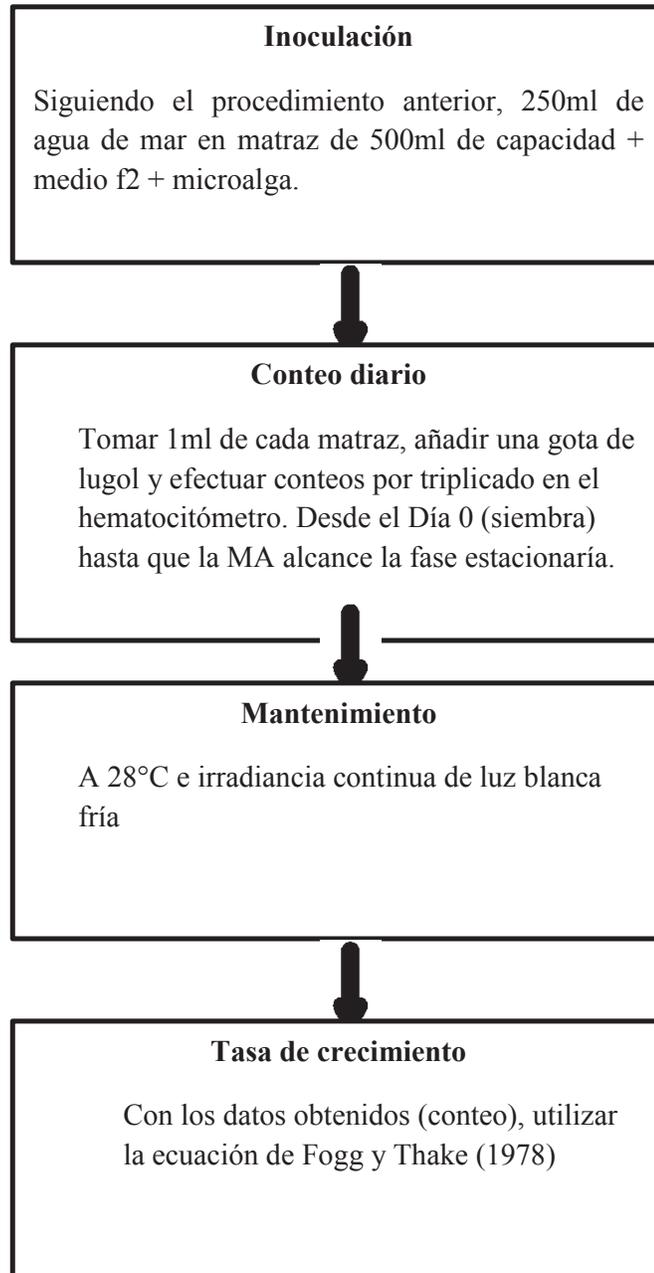
ANEXO 1: Mantenimiento del Cultivo de la Microalga (MA) *I. galbana*

Mantenimiento del cultivo de la microalga (MA)



ANEXO 2: Evaluación de la Tasa de Crecimiento

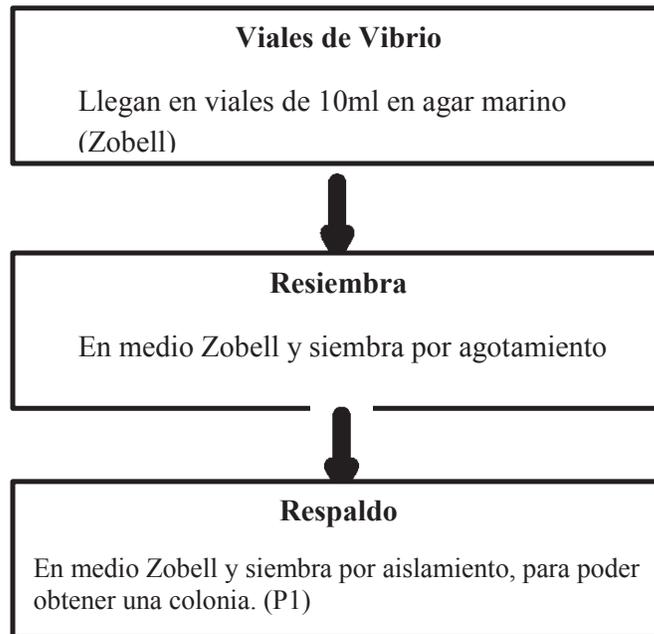
Para evaluar la tasa de crecimiento de la microalga se efectuarán cultivos por triplicado



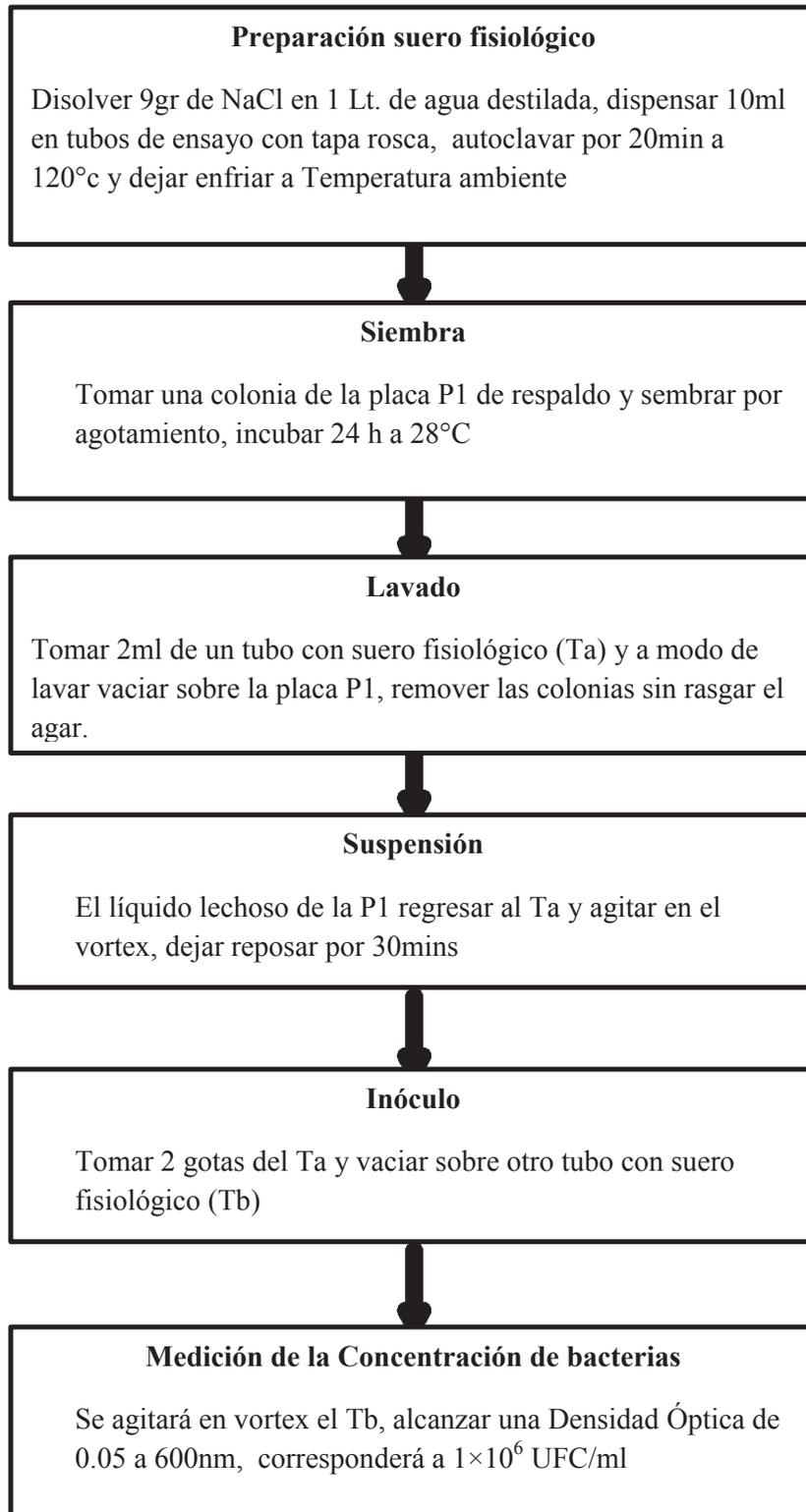
2. *Vibrio spp.*

ANEXO 3: Cultivo de *Vibrio spp.*

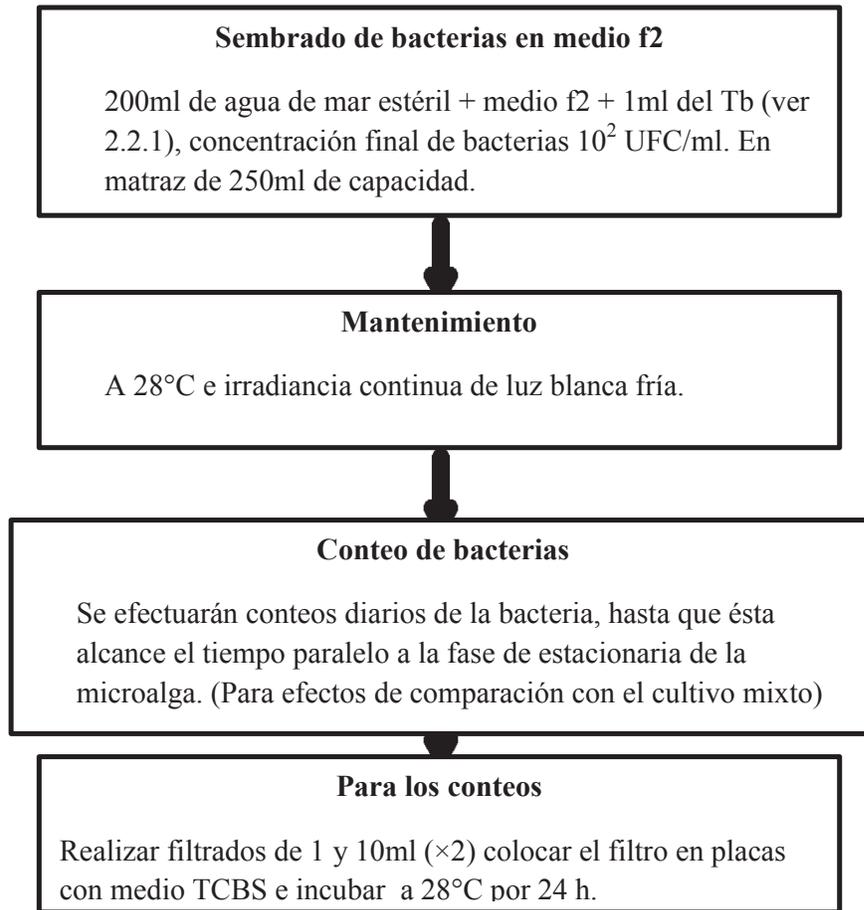
Se realizan dos sembrados de los viales originales con el objetivo de resguardar los viales de posibles contaminaciones que puedan darse.



ANEXO 4: Preparación del Inóculo de Bacterias

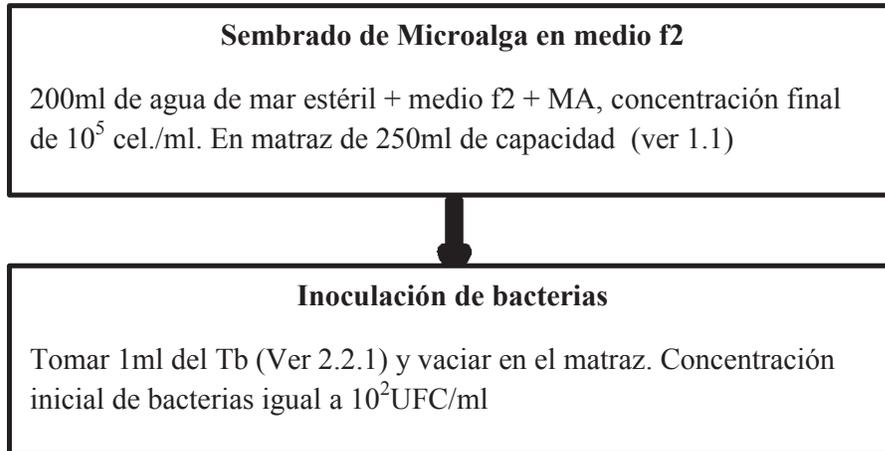


ANEXO 5: Evaluación del Crecimiento de *Vibrio spp.*

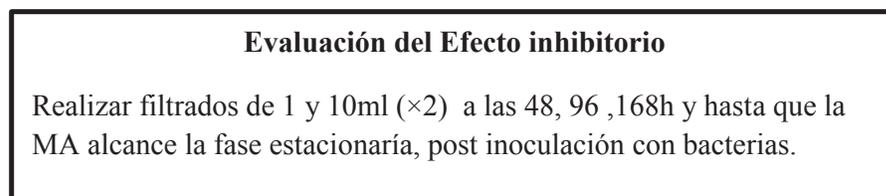


ANEXO 6: Ensayo de Inhibición del Crecimiento de *Vibrio spp.*

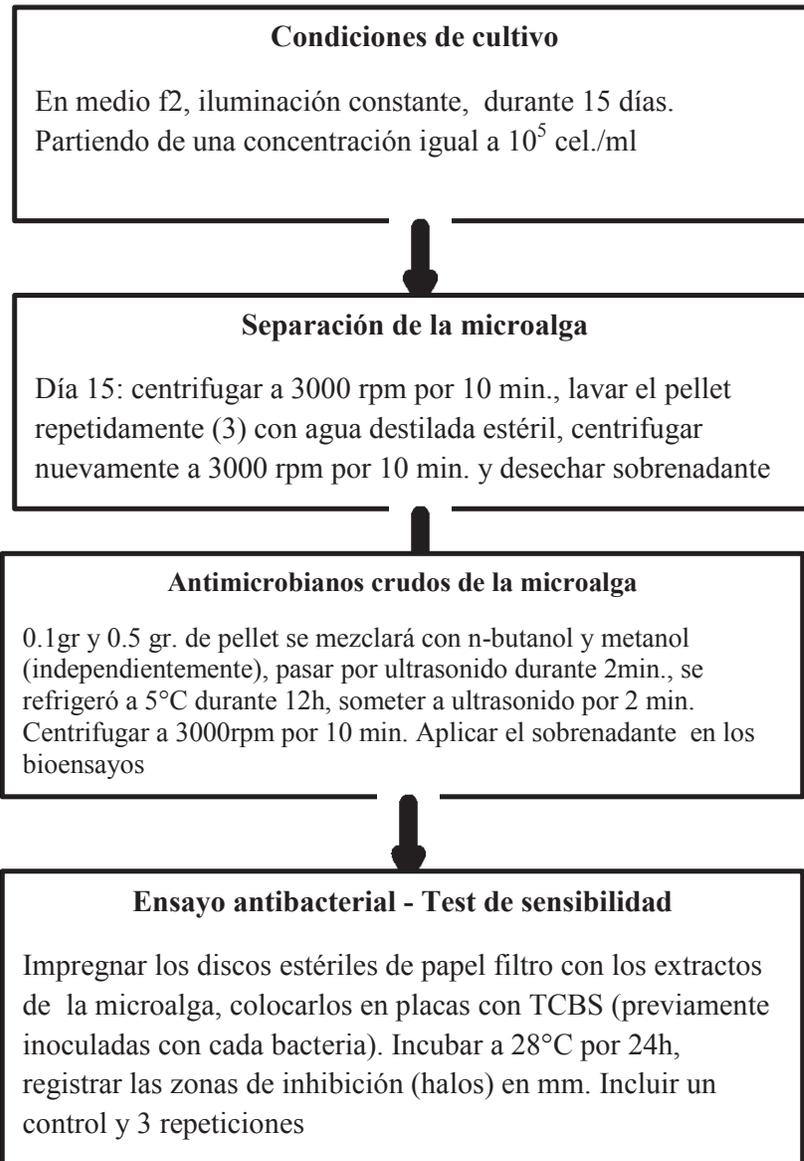
Los cultivos mixtos se realizaran por triplicado



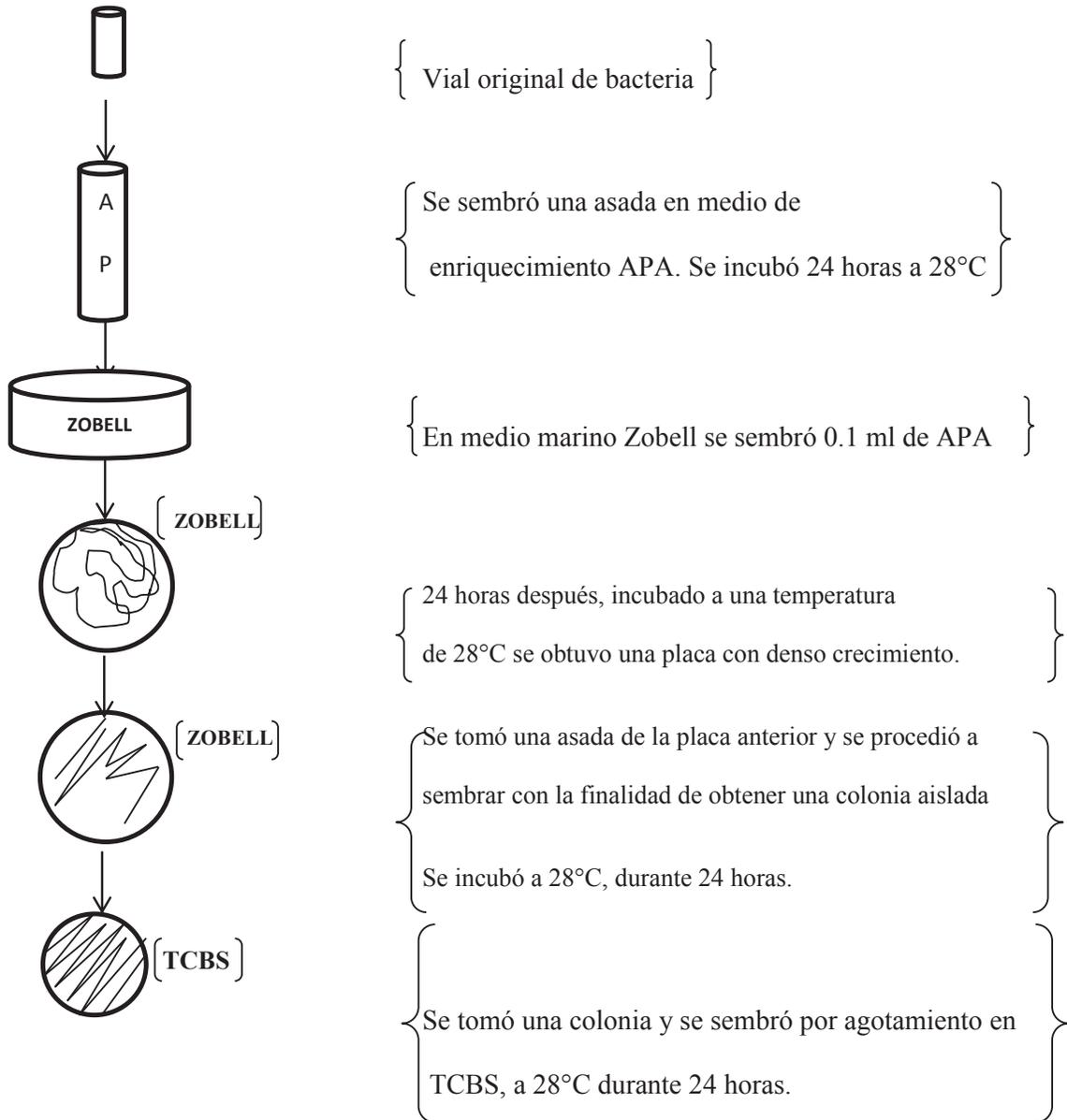
ANEXO 7: Conteo de Bacterias



ANEXO 8: Halos de Inhibición



ANEXO 9: Proceso de Recuperación de Bacterias.



ANEXO 10: Prueba de Muestras Independientes, para el Crecimiento de *Isochrysis galbana* IMP-BG 010 en Cultivo Axénico y en

Presencia de *Vibrio furnisii*.

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		Prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
N° Células por ml	Se asumen varianzas iguales	96,027	,000	2,978	94	,004	637,866,250,000	214,176,946,824	212,612,901,375	1,063,119,598,625
	No se asumen varianzas iguales			2,978	57,471	,004	637,866,250,000	214,176,946,824	209,060,549,382	1,066,671,950,618
									Inferior	Superior