UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

EVALUACIÓN DE MICROALGAS MARINAS COMO PRODUCTORAS DE COMPUESTOS INHIBIDORES DE *Vibrio parahaemolyticus*.

(Modalidad: Tesis de Grado)

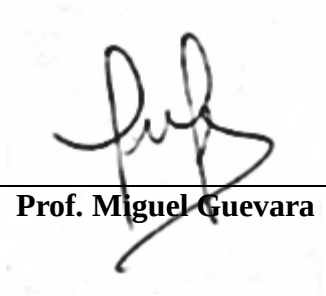
LUSDALYS TERESA BRAVO MAYZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, NOVIEMBRE DE 2017

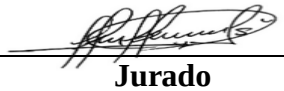
EVALUACIÓN DE MICROALGAS MARINAS COMO PRODUCTORAS DE COMPUESTOS INHIBIDORES DE *Vibrio parahaemolyticus*.

APROBADO POR:



Prof. Miguel Guevara

Jurado



Jurado

ÍNDICE

DEDICATORIA i
AGRADECIMIENTO ii
LISTA DE TABLAS iii
LISTAS DE FIGURAS iv
RESUMEN v
INTRODUCCIÓN 1
METODOLOGÍA 5
Cepas de las microalgas y de Vibrio parahaemolyticus 5
Condiciones de cultivo 5
Parámetros de crecimiento 5
Muestreos de la biomasa 7
Preparación de los extractos 7
Actividad antimicrobiana 8
Concentración mínima inhibitoria 9
Lectura de los resultados 9
Análisis de los resultados 9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 11
CONCLUSIONES 17
RECOMENDACIONES 18
BIBLIOGRAFÍA 19
ANEXOS 25
HOJAS DE METADATOS 26

DEDICATORIA

A

Dios todo poderoso por darme la fortaleza y salud para seguir adelante con mi meta hasta el final y a la virgencita del Valle por interceder ante Él.

Mi madre, Dalis Mayz la mejor madre y padre del mundo por brindarme todo su apoyo y ayuda incondicional, porque mi meta también es la de ella y juntas luchamos por lograrla. Mujer que a pesar de tantas adversidades, siempre mantuvo su dedicación, mujer luchadora el mejor ejemplo que he podido tener, gracias madre…

Mi hijo, Víctor José Lara Bravo el amor de mi vida, el ser que me ha dado un motivo más para seguir adelante porque este logro también es para él. Su llegada a mi vida ha sido lo mejor que me ha pasado. Gracias por ser el mejor hijo del mundo y comportarte de lo mejor, entender lo que nos tocó vivir, días separados y perderme momentos de tu vida, pero ya con el favor de Dios llegaran mejores momentos juntos te AMO…

Mi esposo José por estar presente en este largo recorrido apoyándome, y por soportar vientos y mareas. Vendrán mejores momentos…

Mis hermanos, José, Jorge y Antonio por estar hay presente y responder a mis dudas cuando los necesite prestándome esa mano cuando la necesite, y a mi hermano Freddy que desde el cielo me ilumina y sé que estaría muy orgulloso de verme lograr este sueño.

Mis sobrinos por acompañarme, en especial a Freddy por escucharme y prestarme su ayuda cuando la necesité.

Mis tías Dilia, Arcenis y mi tío Alberto gracias por su granito de arena, siempre presentes en mi caminar.

Mi suegra por su apoyo en los momentos precisos.

Mis primas y primos por estar hay prestándome una ayuda cuando la requería.

A todos los quiero mucho… GRACIAS

AGRADECIMIENTO

A

El Doctor Miguel Guevara, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo y contar con su ayuda incondicional. Muchas gracias por su apoyo y quiero que sepa que es una persona admirable y de mucho valor. Qué bueno es conocer cosas nuevas y fue de mucho agrado trabajar con microalgas y conocer sobre ellas.

El grupo de Laboratorio de microalgas del Instituto Oceanográfico, por haberme recibido en su segunda casa y mostrarme el mejor afecto en especial a la profesora Rora por prestarme su grandiosa colaboración y enseñarme cosas nuevas, la profesora Loly por su cariño y esa virtud a haces sentir que estamos en familia…

Los muchachos Rafa, Elvira, Peñuela, Saidelis por estar siempre pendiente de mi trabajo.

Mi compañera Jerosca por inducirme a tocarle las puertas a mi asesor…

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tasa instantánea de crecimiento (K) y productividad de biomasa (PB) en fase exponencial y densidad celular máxima (DMx) de las diferentes cepas de microalgas. 13

LISTAS DE FIGURAS

Figuras 1. Curvas de crecimiento de las diferentes especies de microalgas evaluadas. 17
Figura 2. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana. Halo de inhibición del extracto etanólico de *Chaetoceros calcitrans* (9) frente a *Vibrio parahaemolyticus*. A: antibiótico comercial. E: Etanol. 13
Figura 3. Prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (µg.ml^{-1}) del extracto etanólico de *Chaetoceros calcitrans* frente a *V. parahaemolyticus.* 14

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar a nueve microalgas marinas: *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Limnothrix* sp., *Nannochloris oculata*, *Chaetoceros muelleri* (cepa de Chile), *Chaetoceros muelleri* (cepa de Araya), *Navicula* sp., *Thalassiosira* sp. y *Chaetoceros calcitrans* como productoras de compuestos inhibidores de *V. parahaemolyticus*. Estas microalgas se sometieron a cultivo durante 20 días y, las biomasas, en fase de crecimiento estacionario, fueron colocadas, separadamente, en dos solventes de diferentes polaridades: etanol y hexano. Los 18 extractos obtenidos fueron evaluados en cuanto a su actividad antivibrio contra *Vibrio parahaemolyticus*, utilizando los métodos de difusión en discos y de concentración mínima inhibitoria. De los extractos analizados, solo el extracto etanólico de *Chaetoceros calcitrans* presentó efecto antibacteriano contra *V. parahaemolyticus* con halos de inhibición y concentración mínima inhibitoria de 22,3 ± 0,2 mm y 8 $\mu g.ml^{-1}$, respectivamente. Estos resultados evidencian el potencial que posee el extracto etanólico de la diatomea *C. calcitrans* como posible tratamiento de las vibriosis que suelen afectar a las granjas acuícolas.

INTRODUCCIÓN

La vibriosis es una enfermedad bacteriana que causa elevadas mortalidades en diferentes especies sometidas a cultivo: camarones (Lavilla *et al*., 1998), peces (Lam *et al*., 2011) y moluscos (Nicolas *et al*., 1996; Liu *et al*., 2000), lo cual se traduce en pérdidas económicas importantes en este tipo de industria (Prado *et al*., 2005; Decamp *et al*., 2008). Esta patología es provocada por diversas especies del género *Vibrio*, entre las que se encuentran *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. campbellii*, *V. carchariae*, *V. damsella*, *V. fischeri*, *V. harveyi*, *V. logei*, *V. mediterranii*, *V. nigripulchritudo*, *V. ordalii*, *V. orientalis*, *V. parahaemolyticus*, *V. pelagicus*, *V. penaeicida*, *V. splendidus* y *V. vulnificus*, entre otros (Chythanya *et al*., 2002).

Las especies de *Vibrio* son bacterias Gram negativas, asociadas a ambientes acuáticos con cierta salinidad, generalmente, bacilos móviles, mesófilos, anaerobios facultativos, oxidasa y catalasa positiva que suelen crecer en agar tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa (TCBS) (Noguerola y Blanch, 2008).

El género *Vibrio* coexiste, normalmente, en los animales de cultivo, colonizando, principalmente, el tracto digestivo, las branquias y la cutícula. En camarones, la vibriosis se presenta cuando las bacterias logran penetrar al interior del organismo, se supone que una de las rutas naturales para ello, es a través del intestino medio y se extiende a los demás órganos vía hemolinfa causando, inicialmente, lesiones tales como necrosis del hepatopáncreas y un alto grado de vacuolización de las células epiteliales de este órgano (Morales, 2013); el proceso infeccioso avanza dando lugar a infecciones generalizadas, involucrando cutícula, hepatopáncreas, órgano linfoide, glándula antenal, corazón, hemolinfa y músculos (Morales, 2008).

En moluscos bivalvos, la vibriosis se caracteriza por provocar reducción de la movilidad y quiescencia de las larvas con el velo extendido. Además, en el margen de las larvas se observan agrupaciones bacterianas (swarmming bacteriano) que, progresivamente, se

hacen más densas y ubicuas. Después de ocho horas, comienzan a observarse larvas muertas por necrosis y a las 18 horas, la mortalidad es del 100% (Elston *et al*., 2008; Rojas *et al*., 2015).

La tendencia mundial para el tratamiento de la vibriosis en las granjas acuícolas se basa en la aplicación de antibióticos (Defoirdt *et al*., 2011); sin embargo, el uso indiscriminado de estos medicamentos ha traído como consecuencia la creación de cepas bacterianas resistentes (Ramírez y Castaño 2009; Thuy *et al*., 2013). Esta situación ha dado lugar a investigaciones enfocadas en la búsqueda de nuevas sustancias antibióticas de diversas fuentes (Hernández *et al*., 2008)

Los ecosistemas marinos, por su gran biodiversidad, constituyen una fuente inagotable de compuestos químicos con aplicaciones terapéuticas (Shannon y Abu, 2016). Entre los organismos marinos que poseen una gran gama de metabolitos secundarios bioactivos que pueden beneficiar a la salud humana y animal se encuentran las microalgas (Raposo *et al*., 2013), las cuales se definen como microorganismos fotosintéticos oxigénicos, de gran variedad morfológica (unicelulares o formando filamentos, cadenas, colonias, o cenobios) que habitan todos los cuerpos de agua donde existan las condiciones más simples para crecer (Abalde *et al*., 1995; De Lara *et al*., 1996).

Los estudios relacionados con la evaluación de principios bioactivos presentes en las microalgas se iniciaron en 1950 (Amaro *et al*., 2011). En los años 80, se dio a conocer que extractos orgánicos de la microalga *Nostoc* son efectivos para el tratamiento de la gota y el cáncer; además, se informó que *Lyngbya majuscula* y nueve cianobacterias del género *Oscillatoria* tuvieron actividad específica contra leucemia en ratones (Blaine y Pyne, 1988). Estos hallazgos estimularon aún más los estudios que involucran a las microalgas como productoras de sustancias antibióticas.

En las últimas décadas, las microalgas han sido objeto de amplias investigaciones, enfocadas hacia la búsqueda de compuestos novedosos que tengan agentes terapéuticos

útiles (antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoos y antiplasmodiales). Al respecto, Najdenski *et al*. (2013) demostraron que los exopolisacáridos de las cianobacterias *Gloeocapsa* sp. y *Synechocystis* sp. presentaron significativa actividad antibacteriana y antifúngica. Amaro *et al*. (2011) y Chen *et al*. (2012) informaron que los extractos orgánicos de *Phaeodactylum tricornutum* y *Picochlorum*, sp., respectivamente, inhiben el crecimiento de diferentes especies de *Vibrio*.

La actividad antimicrobiana de las microalgas ha sido atribuida a compuestos pertenecientes a diferentes clases químicas, tales como: indoles, terpenos, acetogeninas, fenoles, alcaloides, ácidos grasos e hidrocarburos halogenados volátiles, entre otros (Mayer y Hamann, 2005).

Al respecto, Santoyo *et al*. (2009) reportaron que la actividad biológica que presenta la microalga *Haematococcus pluvialis* contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* es atribuida a los ácidos grasos de cadenas cortas: ácido butanoico y metil lactato; por su parte, Desbois *et al*. (2009) demostraron que el ácido graso poliinsaturado, 20:5 n-3, eicosapentaenoico (EPA), obtenido de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* es el responsable de la inhibición del crecimiento de las bacterias Gram positivas, causantes de enfermedades en humanos: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus* y de la Gram negativa, patógeno de peces y moluscos, *Listonella anguillarum*. Mo *et al*. (2010) aislaron de la microalga *Fischerella ambigua* el alcaloide fischambiguine B, el cual fue activo contra *Mycobacterium tuberculosis*, *M*. *smegmatis* y *S. aureus*.

En Venezuela, los trabajos de investigación referidos a la actividad biológica se han realizado, principalmente, con extractos orgánicos de plantas terrestres, como *Melochia villosa* (De Armas *et al*., 2013), *Melochia tomentosa* (Espinoza, 2010), macroalgas, tales como: *Derbesia vaucheriaeformis*, *Ulva fasciata*, *Halimeda opuntia*, *Hypneamus ciformis*, *Gracilariopsis tenuifrons*, *Gelidium serrulatum* y *Kappaphycus alvarezi* (Charzeddine y Fariñas, 2001), invertebrados marinos: *Aplysina fistularis* (Morales *et*

al., 2000) y hongos marinos (Acosta *et al*., 2011), entre otros. El uso de microalgas como fuente potencial de extractos bioactivos ha sido poco documentado en nuestro país, encontrándose solamente el reporte de Rosales *et al*. (2012), quienes determinaron que los extractos hidrosolubles y liposolubles de *Nostoc* LAUN 0015 inhibieron el crecimiento de *S. aureus*.

Tomando en consideración los planteamientos antes señalados, aunado al hecho de que las microalgas como organismos productores de compuestos activos tienen muchas ventajas, entre las que destacan: su alta diversidad, rápido crecimiento y su plasticidad fisiológica para responder diferencialmente a cambios de las condiciones ambientales (Whitton y Potts 2000, Rosales *et al*., 2005, Panda *et al*., 2006), la presente investigación planteó la evaluación de nueve microalgas marinas como productoras de compuestos inhibidores de *V. parahaemolyticus*, patógeno que causa severos daños en la acuicultura.

METODOLOGÍA

Cepas de las microalgas y de Vibrio parahaemolyticus

Las microalga utilizadas en esta investigación fueron *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Limnothrix* sp., *Nannochloris oculata*, *Chaetoceros muelleri* (cepa de Chile), *Chaetoceros muelleri* (cepa de Araya), *Navicula* sp., *Thalassiosira* sp. y *Chaetoceros calcitrans*. Estas cepas se mantienen en el banco de germoplasma de algas de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Venezuela, bajo condiciones controladas de laboratorio (23 ± 1 °C, 5000 lux, fotoperiodo de 12 horas luz: 12 horas oscuridad) en medio f/2 Guillard (Guillard, 1975) a 37 UPS. La cepa de *V. parahaemolyticus* que se usó como organismo revelador fue donada por el centro de investigaciones biológicas del noreste (CIBNOR), México.

Condiciones de cultivo

Las microalgas se cultivaron, axénicamente, por duplicado, durante 20 días en matraces con 1 500 ml de medio f/2 Guillard (0,88 mmol l^{-1} de nitrógeno) a 23 ± 1 °C, pH de 7,8; irradiancia de 5 000 lux con fotoperíodo de 12 horas luz: 12 horas oscuridad. Los cultivos se realizaron de forma unialgal y se agitaron, manualmente, dos veces al día.

Parámetros de crecimiento

Los parámetros de crecimiento analizados en las diferentes microalgas unicelulares fueron densidad poblacional, tasa instantánea de crecimiento y productividad de biomasa. La densidad poblacional se realizó cada 24 horas, para lo cual se tomaron muestras (1 ml), por triplicado de cada tratamiento, y se fijaron con 50 µl de una solución de lugol al 10% para realizar el recuento celular por microscopia óptica, utilizando un hematocitómetro Neubaüer de 0,1 mm de profundidad. Con los datos obtenidos, se elaboraron las curvas de crecimiento y a partir de éstas, se determinaron las diferentes fases de crecimiento y se calcularon las tasas instantáneas de crecimiento (K) y la productividad de biomasa (P), de acuerdo con las siguientes ecuaciones y

siguiendo las recomendaciones de Madigan *et al*. (1999) y Hempel y Petrick (2012).

$$K=\frac{\log_{10}x_1-\log_{10}x_0}{0{,}301\ (t_1-t_0)}$$

Donde:

K = tasa instantánea de crecimiento (div.día^{-1}).

t_1, t_0 = tiempo (días) final e inicial de cultivo en fase de crecimiento exponencial.

X_1, X_0 = densidad poblacional (cel.ml^{-1}) final e inicial en fase de crecimiento exponencial.

$$P=\frac{XF-X0}{TF-T0}$$

Donde:

P = productividad de biomasa (cel.ml^{-1}.dia^{-1}).

TF, T0 = tiempo final e inicial de cultivo en fase de crecimiento exponencial.

XF, X0 = densidad poblacional final e inicial en fase de crecimiento exponencial.

Para la microalga *Limnothrix* sp., por ser una microalga filamentosa, los parámetros de crecimiento analizados fueron biomasa seca, tasa de instantánea de crecimiento y productividad de biomasa. Los análisis de masa seca se realizaron cada 48 horas hasta el final del ensayo, mediante el sistema de filtración Millipore©, para lo cual se filtraron 5 ml, por quintuplicado, de los cultivos de esta microalga, a través de filtros de fibra de vidrio de 0,45 µm de tamaño de poro, y posteriormente, se lavaron con 5 ml de formiato de amonio, 0,5 moles l^{-1} (pH 7,5) y secados hasta masa constante a 60°C en una estufa marca Memert. Con los datos obtenidos, se elaboraron las curvas de crecimiento y a partir de éstas, se determinaron las diferentes fases de crecimiento y se calcularon las tasas instantáneas de crecimiento (K) y la productividad de biomasa en la fase exponencial, de acuerdo con las siguientes ecuaciones y siguiendo las recomendaciones de Madigan *et al*. (1999) y Hempel y Petrick (2012).

$$K=\frac{\log_{10}x_1-\log_{10}x_0}{0{,}301\ (t_1-t_0)}$$

Donde:

K = tasa instantánea de crecimiento (mg.día^{-1}).

t_1, t_0 = tiempo final e inicial de cultivo en fase de crecimiento exponencial.

X_1, X_0 = biomasa celular final e inicial en fase de crecimiento exponencial.

$$P=\frac{XF - X0}{TF- T0}$$

Donde:

P = productividad ($mg.l^{-1}.día^{-1}$).

t_1, t_0 = tiempo (días) final e inicial de cultivo en fase de crecimiento exponencial.

X_1, X_0 = biomasa celular ($mg.ml^{-1}$) final e inicial en fase de crecimiento exponencial.

Muestreos de la biomasa

Una vez realizadas las curvas de crecimiento y evidenciadas las diferentes fases de crecimiento, se procedió a repetir los cultivos bajo las mismas condiciones señaladas anteriormente. Cuando los cultivos alcanzaron la fase de crecimiento estacionario (20 días) se hizo la cosecha total de la biomasa, mediante la centrifugación a 4 000 rpm por 10 min. Las biomasas obtenidas se mantuvieron congeladas hasta la preparación de los diferentes extractos y evaluación de la actividad antibacteriana.

Preparación de los extractos

Las biomasas de las diferentes microalgas (15 g, aproximadamente) se sometieron a extracción, separadamente, con dos solventes de diferentes polaridades (etanol y n-hexano). En cada solvente, las biomasas se homogenizaron y dejaron reposar durante siete días, para permitir la extracción de los metabolitos secundarios, siguiendo recomendaciones de Zheng *et al*. (2004). A continuación, se filtró el material de extracción y el sobrenadante se colocó en una estufa a una temperatura de 40°C para evaporar los solventes, obteniendo así los extractos etanólicos y hexánicos de cada una de las biomasas. De esta forma, quedaron conformados 18 extractos (9 etanólicos y 9 hexánicos).

Actividad antimicrobiana

Método de difusión

El efecto antivibrio de los 18 extractos se evaluó, por triplicado, utilizando como microorganismo revelador una cepa de *V. parahaemolyticus*, mediante la técnica de difusión en agar o método del antibiograma, descrito por Bauer *et al.* (1966).

Discos estériles de papel de filtro (Whatman N° 3 de 6 mm de diámetro) se impregnaron con 25 µl del extracto en prueba (40 mg. ml^{-1}), lo cual proporciona una concentración final de 1 000 µg de extracto por disco. Paralelamente, se impregnaron, separadamente, discos con 25 µl del solvente de extracción (etanol o hexano) y con 25 µl de antibiótico comercial (sulfato de estreptomicina), los cuales sirvieron como controles negativos y positivos, respectivamente.

Los discos, después de dejarse secar durante cuatro horas a temperatura ambiente, se colocaron sobre agar Mueller Hinton (HIMEDIA, Laboratorios Pvt. Limted, Bombay-India), servido en placas de Petri, previamente inoculado (usando hisopos estériles) con la inóculo de *V. parahaemolyticus*, con una turbidez similar al 0,5 de la escala McFarland (Anexo 1). En cada placa se colocaron cinco discos de manera equidistante: 1) tres discos con extractos a evaluar, 2) un disco con el solvente de extracción y 3) un disco con antibiótico comercial.

Posteriormente, las placas se preincubaron a 5°C, durante 12 horas, para facilitar que el extracto difunda en el medio de cultivo y luego, se incubaron a 29 ± 1°C por 24 horas, para permitir el crecimiento bacteriano.

Lectura de los resultados

Los extractos que contenían principios antivibrio produjeron un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos, el cual se midió mediante una regla graduada en mm. Los diámetros de los halos de inhibición se interpretaron en las

categorías: resistente (≤ 11 mm), intermedio (12–13 mm) y sensible (≥ 14 mm), de acuerdo con los criterios de Leiva (1999a).

Concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI), es decir, la cantidad mínima de extracto capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos, se determinó empleando un método de dilución en tubos con medio de cultivo. Los extractos de las microalgas que mostraron mayor tamaño del halo de inhibición de *V. parahaemolyticus* se les determinó su CMI, por triplicado, utilizando concentraciones de 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; y 128 $\mu g.ml^{-1}$ de cada extracto (en tubos de vidrio con 2 ml de caldo Mueller Hinton, DIFCO™ con 2,5% de NaCl), rango comúnmente usado para probar actividad antibacteriana (Roque *et al*., 2001). Paralelamente y de forma similar, se determinó la CMI del antibiótico comercial. Los tubos con las diferentes concentraciones de extractos y de antibiótico fueron inoculados con *V. parahaemolyticus* (100 µl con una turbidez similar al 0,5 de la escala McFarland). Posteriormente, se incubaron durante 24 horas en una incubadora a 29±1 ºC. Finalmente, se observó la turbidez en cada tratamiento para todas las réplicas.

Lectura de los resultados

La CMI se definió como la concentración más baja del extracto crudo de la microalga o del antibiótico que inhibió el crecimiento visible de la bacteria después de su incubación (Andrews, 2001). Los resultados de la CMI se interpretaron en las categorías: sensible (≤ 8 $\mu g.ml^{-1}$), medianamente sensible (16 $\mu g.ml^{-1}$) y resistente (≥ 32 $\mu g.ml^{-1}$) de acuerdo con los criterios de Leiva (1999b).

Análisis de los resultados

Los datos de los parámetros de crecimiento de las diferentes microalgas fueron graficados y tabulados para una mejor interpretación. La actividad antivibrio de los extractos analizados fue comparada de manera visual con el control positivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las curvas de las diferentes cepas de microalgas analizadas se muestran en la figura 1. Se observa que *Isochrysis galbana* y *Nannochloris oculata* no mostraron fase de adaptación y sus fases exponenciales se prolongaron hasta los días ocho y diez, respectivamente. *Tetraselmis suecica* y *Thalassiosira* sp. presentaron fases de adaptación de dos días y a partir de allí y hasta el décimo día estuvieron en fase de crecimiento exponencial. Las diatomeas, *Chaetoceros calcitrans* y *Chaetoceros muelleri* (cepa Araya y cepa Chile) presentaron fases de adaptación de dos días, con fases exponenciales entre los días dos-seis y dos-cuatro, respectivamente. Por su parte, *Navicula* sp. presentó fases de adaptación de cuatro días, prolongándose la fase exponencial durante los días cuatro-seis. La cianobacteria *Limnothrix* sp. tuvo una fase de adaptación de cuatro días, y seguidamente entró en fase exponencial hasta el día doce.

Las tasas de crecimiento instantáneo, productividad de biomasa y densidades poblacionales máximas se muestran en la tabla 1. Las tasas de crecimiento instantáneo para las microalgas unicelulares variaron entre 0,21-2,46 div.día^{-1}, correspondiendo los mayores valores a *C. muelleri* (cepa Chile, 2,46 ± 0,172 div.dia^{-1}), *C. muelleri* (cepa Araya, 2,45 ± 0,147 div.dia^{-1}), *Navicula* sp. (2,32 ± 0,116 div.día^{-1}) y *C. calcitrans* (1,48 0,096 div.día^{-1}). En *Limnothrix* sp., la tasa de crecimiento fue de 0,21 ± 0,013 mg.día^{-1}. Las mayores productividades de biomasa (cel.ml^{-1}.día^{-1}) las mostraron las cepas de diatomeas: *C. calcitrans* (2 212 500 ± 154 875), *C. muelleri* (cepa Chile, 2 127 ± 170 200), *C. muelleri* (cepa Araya, 2 102 500 ± 105 125) y *Navicula* sp. (1 440 000 ± 72 000). *Limnothrix* sp. alcanzó una productividad de 0,27 ± 0,0135 mg.ml^{-1}.día^{-1}.

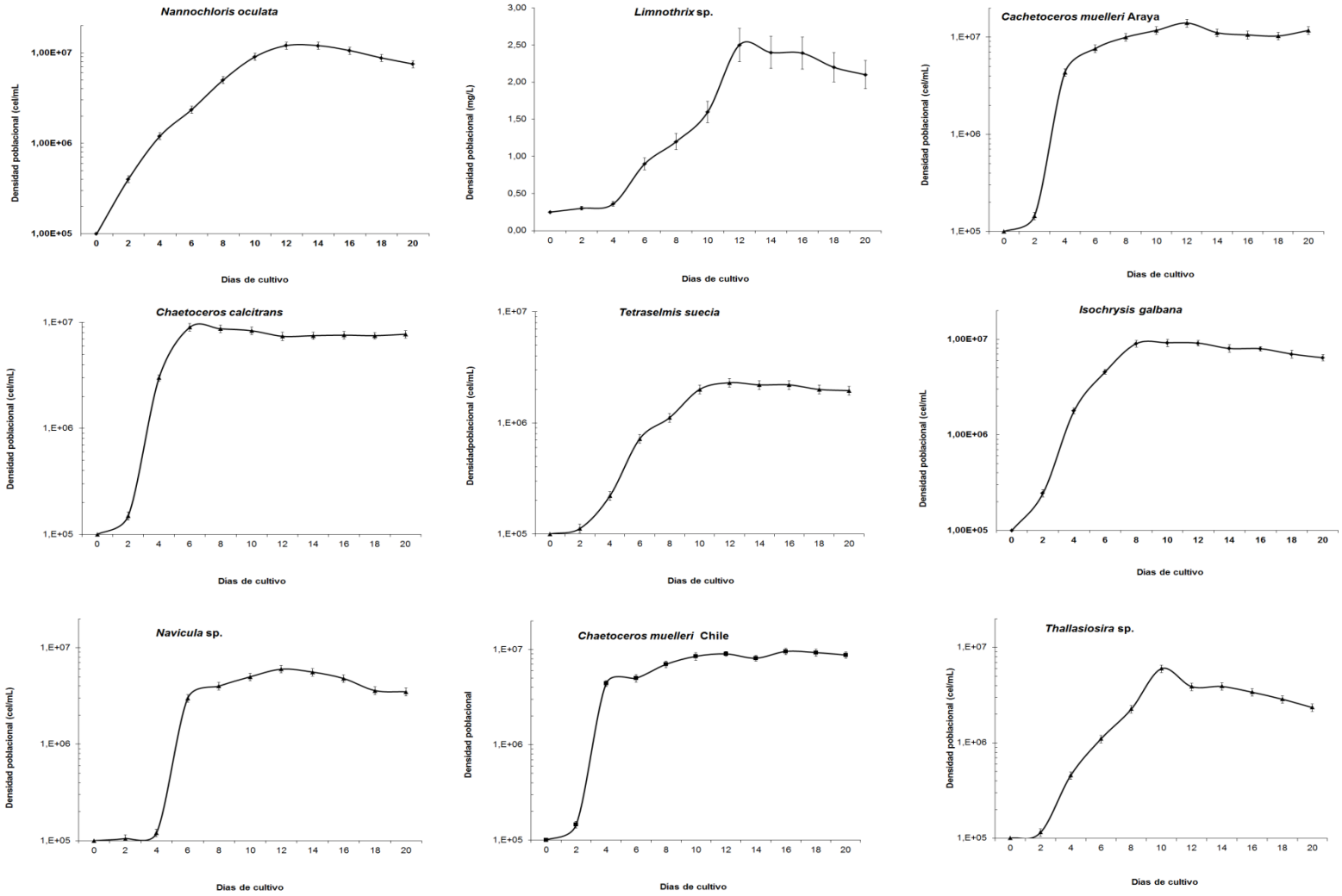
Con respecto a las densidades poblacionales máximas (cel.ml^{-1}) registradas en los cultivos de microalgas, se observó que *C. muelleri* (cepa Araya) fue la que alcanzó los mayores valores (14 000 000 ± 1 260 000), seguida de *Nannochloris oculata* (12 000

000 ± 1 080 000), *C. muelleri* (cepa Chile, 9 560 000 ± 764 800) y *C. calcitrans* (9 000 000 ± 720 000).

Las diferencias en el crecimiento de las microalgas en este trabajo puede deberse a que cada especie y/o cepa proviene de un origen geográfico distinto, con características fisicoquímicas diferentes, ya que existe variabilidad genética entre cepas, lo cual repercute en las características biológicas como morfología, tolerancia a temperatura, tasa de crecimiento, calidad y composición de las células (López, A. *et al*., 1994; Wikfors y Patterson, 1994; Sayegh *et al*., 2007).

Para la selección de microalgas, como posibles candidatas para la extracción de metabolitos bioactivos, se debe tomar en consideración la alta productividad de biomasa, dado que de esta manera, se garantiza disponibilidad de materia prima. En la presente investigación, las microalgas que presentaron mayores valores de biomasa y productividad fueron las diatomeas, específicamente: *Chaetoceros muelleri* (cepa Chile), *Chaetoceros muelleri* (cepa Araya), *Chaetoceros calcitrans* y *Navicula* sp. Esta característica es propia de las diatomeas (Illana, 2008) y esto permite inferir que la producción masiva de estos organismos garantiza un suministro constante y elevado de la biomasa de este tipo de microalgas.

Con respecto a la bioactividad presentada por las microalgas evaluadas, de los 18 extractos analizados, solo el extracto etanólico de *C. calcitrans* mostró actividad antibacteriana contra *Vibrio parahaemolyticus*, con un halo de inhibición de 22,3 ± 0,2 mm de diámetro (figura 2) y una CMI de 8 ± 0 $\mu g.ml^{-1}$ (figura 3). Estos resultados permiten catalogar a *V. parahaemolyticus* como una bacteria sensible frente al extracto etanólico de *C. calcitrans*, según los criterios de Leiva (1999a, b). El control positivo (antibiótico comercial) produjo halos de inhibición de 32 ± 0,15 mm y una CMI de 5 ± 0 $\mu g.ml^{-1}$.



Figuras 1. Curvas de crecimiento de las diferentes especies de microalgas evaluadas.

Tabla 1. Tasa instantánea de crecimiento (K) y productividad de biomasa (PB) en fase exponencial y densidad celular máxima (DMx) de las diferentes cepas de microalgas.

Cepas de microalgas	K Div.día^{-1}	PB (cel.ml^{-1}.día^{-1})	DMx (cel.ml^{-1})
C. muelleri (cepa Chile)	2,46 ± 0,172	2 127 500 ± 170 200	9 560 000 ± 764 800
C. muelleri (cepa Araya)	2,45 ± 0,147	2 102 500 ± 105 125	14 000 000 ± 1 260 000
C. calcitrans	1,48 ± 0,096	2 212 500 ± 154 875	9 000 000 ± 720 000
T. suecica	0,52 ± 0,036	236 000 ± 18 880	2 300 000 ± 207 000
Thalassiosira sp.	0,71 ± 0,056	735 625 ± 58 850	6 000 000 ± 540 000
Navicula sp	2,32 ± 0,116	1 440 000 ± 72 000	6 000 000 ± 540 000
I. galbana	0,81 ± 0,056	1 112 500 ± 77 875	9 200 000 ± 828 000
N. oculata	0,65 ± 0,035	890 000 ± 71 200	12 000 000 ± 1 080 000
Limnothrix sp.	0,21 ± 0,013 mg.día^{-1}	0,27 ± 0,0135 mg.ml^{-1}.día^{-1}	2,50 ± 0,225 mg.ml^{-1}

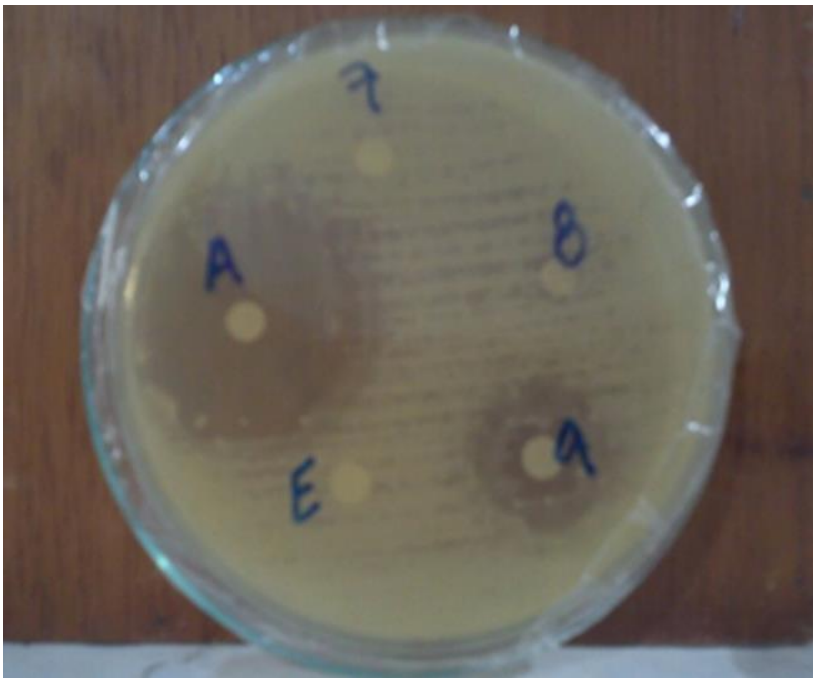


Figura 2. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana. Halo de inhibición del extracto etanólico de *Chaetoceros calcitrans* (9) frente a *Vibrio parahaemolyticus.* A: antibiótico comercial. E: Etanol.

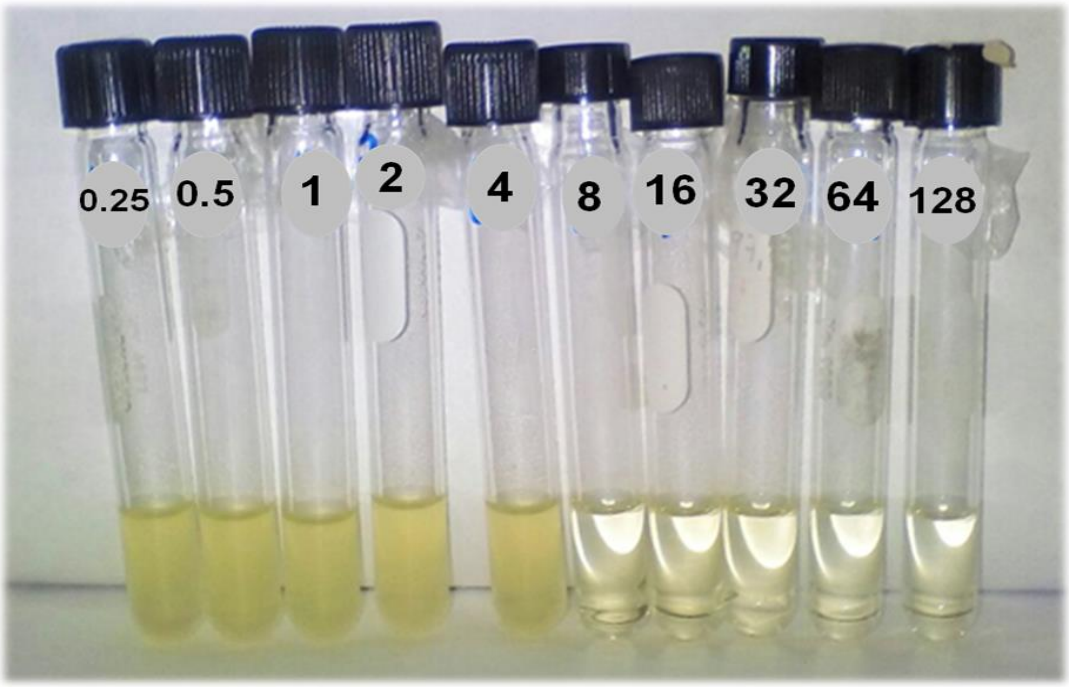


Figura 3. Prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (µg.ml^{-1}) del extracto etanólico de *Chaetoceros calcitrans* frente a *V. parahaemolyticus.*

Numerosos estudios, al igual que la presente investigación, han evidenciado la actividad antibacteriana de extractos orgánicos de diferentes microalgas, incluidas las diatomeas (Pesando, 1990). Investigaciones realizadas por Bruce y Duff (1967); Nagayama *et al*. (2002); Shimizu (2003); Avedaño *et al*. (2005) y Paul *et al*. (2007) afirman que las diatomeas son productoras de metabolitos que exhiben un arreglo diverso de actividad bacteriana, tales como ácidos grasos, polisacáridos, glicolípidos, terpenoides y péptidos. Esta característica, aunada a la amplia diversidad de especies, convierten a este grupo de microalgas en una alternativa potencial de nuevos antibióticos naturales y, por lo tanto, de agentes de biocontrol (Defoirdt *et al*., 2007).

La actividad antagónica de las diatomeas sobre comunidades bacterianas también ha sido descrita. La presencia de estas microalgas afecta la composición de las comunidades bacterianas, principalmente, por medio de la producción de sustancias antibacterianas que son liberadas de manera extracelular, acción conocida como alelopatía. La alelopatía es un mecanismo mediante el cual el crecimiento de

microorganismos se puede ver afectado de manera positiva o negativa, debido a la producción de sustancias exocrinas por parte de un microorganismo en particular. A su vez, el efecto de estas sustancias puede variar dependiendo de la condición fisiológica de las células o de la fase de crecimiento en que se encuentre el cultivo (Maestrini y Bonin, 1981). Entre las especies que han resultado exitosas para el control de bacterias en cultivos se encuentran *Chaetoceros* sp., *Skeletonema costatum* y *Tetraselmis* sp., las cuales han sido extensamente descritas como microalgas con capacidad inhibitoria de bacterias (Riquelme y Avedaño, 2003; Tendencia y de la Peña, 2003).

En esta investigación, el extracto etanólico de *C. calcitrans* inhibió el crecimiento de *V. parahaemolyticus*. Este resultado guarda relación con lo publicado previamente por Lio *et al*. (2005) y Seraspe *et al*. (2007, 2012), quienes refirieron la acción antibacterial de extractos polares de *C. calcitrans* contra diferentes especies de *Vibrio* y otros patógenos bacterianos.

En cuanto a la naturaleza química de los extractos, los resultados de la presente investigación guardan relación con lo señalado por Lustigman (1988), quienes evidenciaron actividad antibacteriana de extractos polares, por ejemplo etanol, de *Dunaliella salina* contra *Vibrio*. De igual forma, González *et al*. (2012) encontraron que extractos polares de la diatomea *Skeletonema costatum* y la clorofita *Dunaliella tertiolecta* inhiben el crecimiento de *V. campbellii*.

Otras investigaciones, a diferencia de las anteriores, han señalado mayor actividad antibacteriana en extractos no polares. Por ejemplo, Seraspe *et al*. (2012) reportan actividad significativa de los extractos hexánicos de diatomeas contra *V. harveyi*.

Las marcadas diferencias en las microalgas en cuanto a la producción de metabolitos inhibidores de *Vibrio* pueden estar relacionadas con la fase de cultivo en que se encuentra la microalga en el momento de la cosecha. En esta investigación, las microalgas se cosecharon en la fase estacionaria, siguiendo recomendaciones de Mian *et*

al. (2003), quienes indicaron que en esta fase las microalgas suelen producir compuestos bioactivos. Sin embargo, pudiera ser posible detectar una mayor actividad biológica si se usa biomasa de microalgas procedentes de cultivos en fase exponencial, tal como lo señaló Van *et al*. (2008), quienes indicaron la capacidad de algunas microalgas como *Fibrocapsa japonica*, en fase exponencial, de inhibir *V. fisheri*. Estos autores afirman que la producción de metabolitos secundarios está regulada por la tasa de crecimiento, por lo que existe la posibilidad que en fases donde la tasa de crecimiento es mayor (exponencial), la producción de metabolitos secundarios se favorezca

Esta investigación demostró la presencia de actividad antivibrio en el extracto etanólico de la diatomea *C. calcitrans*, el cual podría ser utilizado en los tratamientos de vibriosis que afectan a las granjas camaroneras y piscícolas. Posteriores purificaciones y análisis químicos de este extracto permitiría elucidar la estructura del compuesto responsable de la actividad biológica; además, sería interesante evaluar otras actividades biológicas de este extracto, por ejemplo: analgésicos, antiinflamatoria, antiviral, etc., lo que permitiría catalogarlo como posible compuesto con aplicaciones farmacéuticas.

CONCLUSIONES

Las microalgas *Chaetoceros muelleri* (cepa Chile), *C. muelleri* (cepa Araya, *Navicula* sp. y *C. calcitrans* presentaron las mayores tasas de crecimiento instantáneo.

Las mayores productividades de biomasa (cel.ml.día^{-1}) las mostraron las microalgas *C. calcitrans*, *C. muelleri* (cepa Chile), *C. muelleri* (cepa Araya) y *Navicula* sp.

Los cultivos de *C. muelleri* (cepa Araya), *Nannochloris oculata*, *C. muelleri* (cepa Chile) y *C. calcitrans* registraron las mayores densidades celulares.

El extracto etanólico de *Chaetoceros calcitrans* fue el único que inhibió el crecimiento de *V. parahaemolyticus,* mostrando que esta bacteria es sensible a este extracto.

RECOMENDACIONES

Evaluar otras especies de microalgas como posibles productoras de metabolitos bioactivos.

Evaluar la biomasa de *Chaetoceros calcitrans* en otra fase de crecimiento.

Purificar y caracterizar químicamente el o los compuestos del extracto etanólico de C. calcitrans responsable (s) de la bioactividad contra *Vibrio parahaemolyticus*.

Evaluar la bioactividad del extracto etanólico de *C. calcitrans* contra otras cepas bacterianas.

BIBLIOGRAFÍA

Abalde, J.; Cid, A.; Fidalgo, J.; Torres, E. y Herrero, C. 1995. Microalgas: cultivo y aplicaciones. La Coruña, Servicio de Publicaciones. 210 pp.

Acosta, M.; Guevara, M. y Crescente, O. 2011. Actividad biológica de extractos en acetato de etilo de los hongos *Fusarium camptoceras Wollenw* y *Reinking* y *Aspergillus flocculosus Frisvad* y *Samson*, aislados de ambientes marinos. *Boletín de Investigación Marina y Costera*, *40* (1): 25-39.

Amaro, H.; Guedes, A. y Malcata, F. 2011. Antimicrobial activities of microalgae: an invited review. Science Against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Méndez-Vilas A. (Edt). Formatex research center; Badajoz, Spain.

Andrews, J. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *48* (1): 5-16.

Avedaño, R.; Lody, M., y Riquelme, C. 2005. Producción de sustancias inhibitorias entre bacterias de biopelículas en substratos marinos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía 40* (2):117-125.

Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, I. y Turk, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal Clinic Pathology*, *45* (4): 493-496

Blaine, M. y Pyne, J. 1988. Biological active compound from microalgae. *Enzyme Microbiology Technology*, *8*: 386-394.

Bruce, D. y Duff, D. 1967. The identification of antibacterial products of the marine planctonik alga *Isochrysis galbana*. *Journal of genetic microbiology*, *48*: 293-298.

Charzeddine, L. y Fariñas, M. 2001. Propiedades bioactivas de algas marinas del Nororiente de Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, *40* (1-2): 49-54.

Chen, T.; Lin, H.; Lin, C.; Lu, C. y Chen, Y. 2012. *Picochlorum* as an alternative to *Nannochloropsis* for grouper larval rearing. *Aquaculture*, 338–341: 82–88.

Chythanya, R.; Indrani, K. y Iddya, K., 2002. Inhibition of shrimp pathogenic *vibrio* by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture*, *208*: 1–10.

De Armas, H.; Rodríguez, F. y Salazar, J. 2013. Estudio fitoquímico preliminar y bioactividad de la planta *Melochia villosa* proveniente del estado Amazonas, Venezuela. *Saber*, *25*: 382-389.

Decamp, O.; Moriarty, D. y Levens, P. 2008. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquaculture Research*, *39*: 334-338.

Defoirdt, T.; Boon, N.; Sorgeloos, P.; Verstraete, W. y Bossier, P. 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in biotechnology*, *25* (10): 472-479.

Defoirdt, T.; Sorgeloos, P. y Bossier, P. 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion Microbiology*, *14*: 251–258.

De Lara, I.; Álvarez, G. y Lozano, C.1996. Actividad antibacteriana de algas marinas de Oaxaca, Pacífico Tropical Mexicano. *Revista de Biología Tropical*, *44* (2): 895-898.

Desbois, A.; Spragg, A. y Smith, V. 2009. A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Marine Biotechnology*, *11*: 45–52

Elston, R.; Hasegawa, H.; Humphrey, K.; Polyak, I. y Hase, C. 2008. Re–emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: Severity, environmental drivers, geographic extent and management. *Diseases Aquatic Organisms*, *82*: 119–134.

Espinoza, B. 2010. Análisis fitoquímico y bioactividad de la planta *Melochia tomentosa* (Sterculiaceae). Trabajo de pregrado. Departamento de Química, Universidad de Oriente, Cumaná.

González, O.; Ponce, E. y Sánchez, M. 2012. Bioprospection of microalgae and cyanobacteria as biocontrol agents against *Vibrio campbellii* and their use in white shrimp *Litopenaeus vannamei* culture. J*ournal of the world aquaculture society*, 43 (3).

Guillard, R. 1975. *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates in "Culture of Marine Invertebrate Animals*". (eds: Smith W.L. and Chanley M.H.) Plenum Press, New York, USA. 26-60 pp.

Hempel, N. y Petrick, I. 2012. Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as key characteristics of suitability for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, *24* (6): 1407–1418.

Hernández, A.; Vázquez, R.; Sánchez, M.; Serrano, I. y Martínez, A. 2008. Biodiesel a partir de microalgas. Universidad Nacional Autónoma de México. *Artículo Biotecnología*, *13* (3): 38-61.

Illana, C. 2008. Usos industriales de las algas diatomeas. *Quercus*, 267: 32-37.

Lam, F.; Wu, S.; Lin, S.; Lin, C.; Chen, Y.; Wang, H.; Chen, T.; Lin, H. y Lin, J. 2011 The expression of two novel orange spotted grouper (*Epinephelus coioides*) TNF genes in peripheral blood leukocytes, various organs, and fish larvae. *Fish and Shellfish Immunology, 30*: 618–629.

Lavilla, C.; Leaño, E. y Paner, M. 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent *Vibrio* in the rearing environment. *Aquaculture, 164*: 337-349.

Leiva, J. 1999a. Determinación de la sensibilidad de una bacteria a agentes antimicrobianos: antibiograma. En: manual práctico de microbiología. Díaz, R., Gamazo, C. y López, I. (Edt). Editorial MASSON S.A., Barcelona España.

Leiva, J. 1999b. Determinación de la concentración mínima inhibitoria y de la concentración mínima bactericida. En: manual práctico de microbiología. Díaz, R., Gamazo, C. y López, I. (Edt). Editorial MASSON S.A., Barcelona España.

Lio, G.; Leaño, E.; Peñaranda, M.; Villa-Franco, A.; Sombito, C. y Guanzon, N. 2005. Anti-luminous *Vibrio* factors associated with the "green water" grow-out culture of the tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture, 250*: 1-7.

Liu, P.; Chen, Y.; Huang, C. y Lee, K. 2000 Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultured small abalone, Haliotis diversicolor supertexta, with withering syndrome. *Letters in Applied Microbiology, 31*: 433–437.

López, D.; Segura, C.; García, J.; Sánchez, J. y Garcia, F. 1994. Quantitative genetics of fatty acid variation in *Isochrysis galbana* (Prymnesiophiceae) and *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). *Journal of phycology, 30*: 553-558.

Lustigman, B. 1988. Comparison of antibiotic production from four ecotypes of the marine alga, *Dunaliella*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 40*:18–22.

Madigan, M.; Martinko, J. y Parker, J. 1999. Brock Biología de los microorganismos. Prentice Hall Iberia, Madrid, España.1064 pp.

Maestrini, S. y Bonin, D. 1981. Allelopatic relationships between phytoplankton species. En: platt, T. (ed.). physiological bases of phytoplankton ecology. *Canadian Bulletin Fisheries and aquatic Sciences, 210*: 346 pp.

Mayer, A. y Hamann, M. 2005. Marine pharmacology in 2001–2002: marine compounds with antihelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-

inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Phycology, Part C*, 140: 265-286.

Mian, P.; Heilmann, J.; Bürgi, H. y Sticher, O. 2003. Biological screening of terrestrial and freshwater cyanobacteria for antimicrobial activity, brine shrimp lethality, and cytoxicity. *Pharmaceut*ic *Biology, 41*(4): 243-247.

Mo, S.; Krunic, A.; Santasiero, B.; Franzblau, S. y Orjala, J. 2010. Hapalindole-related alkaloids from the cultured cyanobacterium *Fischerella ambigua*. *Phytochemistry. 71*: 2116–2123.

Morales, M. 2008. *Enfermedades bacterianas*. Guía técnica-patología e inmunología de camarones *penaeidos*. Programa CYTED Red II-D *Vannamei*, Panamá, República de Panamá. pp. 117-134.

Morales, M. 2013. *Camarón: análisis en fresco, herramienta de diagnóstico*. Primera edición. México. CIAD-OIRSA.

Morales, T.; Cubero, J.; Lanz, Z.; Gómez, Y. y Segnini, M. 2000. Actividad antimicrobiana de extractos orgánicos aislados de *Aplysina fistularis (*Demospongiae; Aplysinidae*). Revista de Biología Tropical. 48 (1): 199-206.*

Nagayama, K.; Iwamura, Y.; Shibata, T.; Hirayama, I. y Nakamura, T. 2002. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *50*: 889-893.

Najdenski, H.; Gigova, L.; Iliev, I.; Pilarski, P. Lukavsky, J.; Tsvetkova, I.; Ninova, M. y Kussovski, V. 2013. Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. *International Journal of Food Science and Technology, 48*: 1533-1540.

Nicolas, J.; Corre, S.; Gauthier, G.; Robert, R. y Ansquer, D. 1996. Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Disseases_Aquatic Organisms, 27*:67–76.

Noguerola, I. y Blanch, A. 2008. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. *Journal of Applied Microbiology, 105*: 175–185.

Panda, B.; Jain, P.; Sharma, L. y Mallick, N. 2006. Optimization of cultural and nutritional conditions for accumulation of poly-bhydroxybutyrate in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Biores. Technol, *97*: 1296-1301.

Paul, J.; Arthur, K.; Ritson, R.; Ross, C. y Sharp, C. 2007. Chemical defenses: from compound to communities. *Marine Biological Laboratory 213*: 226-251.

Pesando, D. 1990. Antibacterial and antifungal activities of marine algae. En: Akatsuka, (ed.). Introduction to Applied Phycology. SPB Academic Publishing. Netherlands, 3-26 pp.

Prado, S.; Romalde, J.; Montes, J.; Barja, J. 2005.Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptuniusas* an oyster pathogen. *Diseases Aquatic Organisms, 67*: 209−215.

Ramírez, L. y Castaño, M. 2009. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica, 42*: 263-268.

Raposo, M; Morais, R. y Morais, A. 2013. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences, 93* (15): 479-486.

Riquelme, C. y Avedaño, R. 2003. Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural, 76*: 725-736.

Rojas, R.; Miranda, C.; Opazo, R. y Romero, J. 2015. Characterization and pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with massive mortalities of commercial hatchery–reared larvae of scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Journal of Invertebrate Pathology, 124*: 61–69.

Roque, A.; Molina, A.; Bolán, C. y Gómez, B. 2001. In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. *International Journal of Antimicrobial Agents, 17*: 383-387.

Rosales, N.; Hassanhi, M. y Morales, E. 2012. Actividad Biológica de extractos de dos cepas de la cianobacteria *Nostoc*. *Boletín del centro de investigaciones biológicas*. Universidad Del Zulia, Maracaibo, Venezuela, *46* (1): 45-62.

Rosales, N.; Ortega, J.; Mora, R. y Morales, E. 2005. La salinidad como factor modulador del crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria *Synechococcus* sp. Ciencias Marinas, 31 (2): 349-355.

Santoyo, S.; Rodríguez, I.; Cifuentes, A.; Jaime, L.; García, R.; Señorans, F. e Ibáñez, E. 2009.Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT – Food Science and Technology. 42*:1213-1218.

Sayegh, F.; Radi, N. y Montagnes, D. 2007. Do strain differences in microalgae alter their relative quality as a food for the rotirer *Brachionus plicatilis*?. *Aguaculture*, 273: 665-678.

Seraspe, E.; Tabañag, E. y Maeda, H. 2007. Biological and phytochemical screening of extracts *Chaetoceros calcitrans*. UPV *Journal of Natural Sciences* 12:67-74.

Seraspe, E.; Ticar, B.; Formacion, M.; Pahila, I.; de la Peña, M. y Amar, E. 2012. Antibacterial properties of the microalgae *Chaetoceros calcitrans. Asian Fisheries science, 25:343-356.*

Shannon, E. y Abu, N. 2016. Antibacterial derivatives of marine algae: an overview of pharmacological mechanisms and applications. *Marine Drugs, 14*: 18.

Shimizu, Y. 1993. Microalgal metabolites. Current opinión in microbiology, 6: 236-243.

Tendencia, E. y De la Peña, M. 2003. Investigation of some component of green water system which makes it effective in the initial control of luminous bacteria. *Aquaculture, 218*: 115-119.

Thuy, N; Nguyen, D. y Wergeland, H. 2013. Specific humoral immune response and protection against *Vibrio parahaemolyticus* in orange spotted grouper *Epinehelus coioides*. *Intenational Journal of Aquatic Science, 4*: 24–35.

Van, R.; De Boer, M.; Tyl, M. y Gieskes, W. 2008. Evidence for inhibition of bacterial luminescence by allelochemicals from *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae), and the role of light and microalgal growth rate. *Hidrobiologia, 596:* 289-299.

Whitton, B. y Potts, M. 2000. Introduction to cyanobacteria. En Whitton B., Potts M., editors. The ecology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Países Bajos; pp. 1-11.

Wikfors, G. y Patterson, G. 1994. Differences in strains of *Isochrysis* of importance to mariculture. *Aquaculture, 123*: 127-135.

Zheng, L.; Baumann, U. y Reymond, J. 2004. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Research, 32* (14): 115-117.

ANEXOS

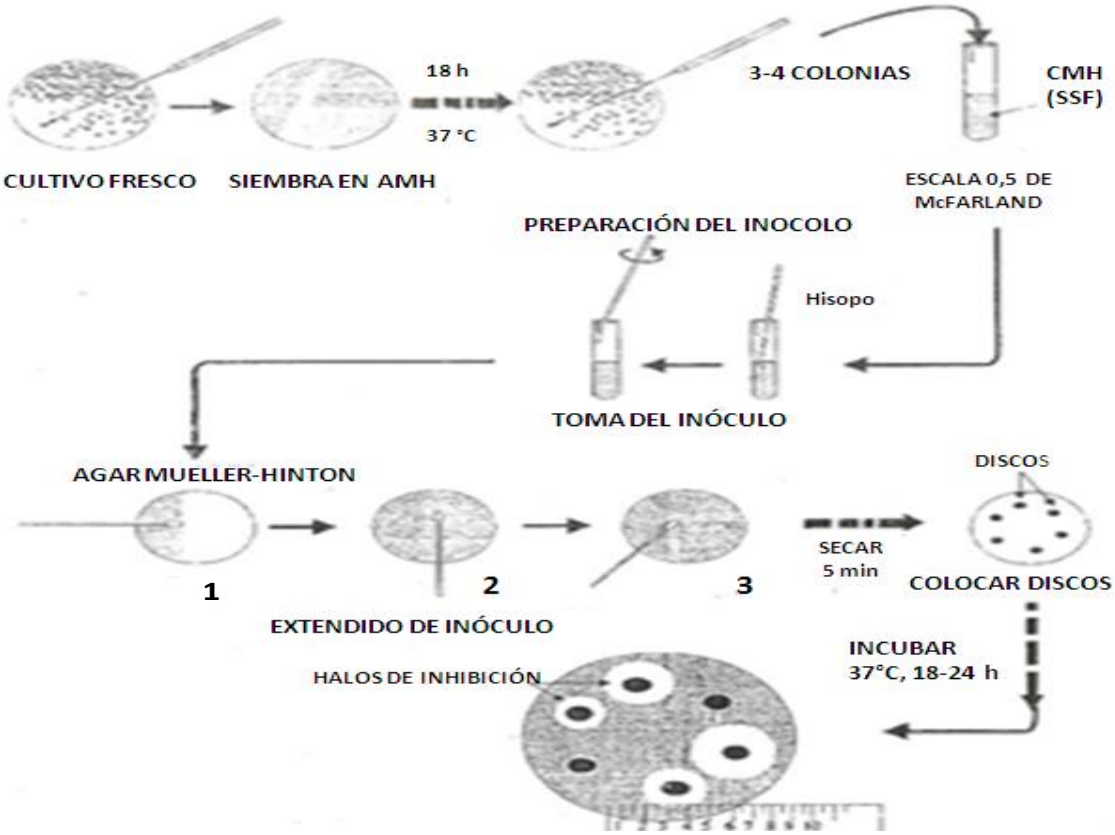
Anexo 1

Preparación del inóculo de Vibrio parahaemolyticus

1. Se tomaron varias colonias de una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* incubadas durante 24 horas en agar marino y se resuspendieron en solución salina fisiológica (0,85%) hasta obtener una turbidez similar al patrón comercial McFarland 0,5

2. Hisopos de algodón estériles se impregnaron con la suspensión bacteriana anterior, se escurrieron rotándolo por las paredes del tubo y seguidamente se sembraron en las placas con agar Mueller Hinton, utilizando el método de siembra por agotamiento.

3. Las placas inoculadas con la suspensión bacteriana se dejaron secar durante 5 min, y posteriormente se colocaron los discos impregnados con los extractos a probar.



HOJAS DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	Evaluación de microalgas marinas como productoras de compuestos inhibidores de *Vibrio parahaemolyticus*.
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	**Código CVLAC / e-mail**	
Bravo Mayz Lusdalys Teresa	**CVLAC**	**19.762.115**
	e-mail	lusdalys_vj@hotmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Microalgas, inhibidores, *Vibrio*

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	**Bioanálisis**

Resumen (abstract):

El objetivo del presente trabajo fue evaluar a nueve microalgas marinas: *Tetraselmis suecica, Isochrysis galbana, Limnothrix* sp., *Nannochloris oculata*, *Chaetoceros muelleri* (cepa de Chile), *Chaetoceros muelleri* (cepa de Araya), *Navicula* sp., *Thalassiosira* sp. y *Chaetoceros calcitrans* como productoras de compuestos inhibidores de *V. parahaemolyticus*. Estas microalgas se sometieron a cultivo durante 20 días y, las biomasas, en fase de crecimiento estacionario, fueron colocadas, separadamente, en dos solventes de diferentes polaridades: etanol y hexano. Los 18 extractos obtenidos fueron evaluados en cuanto a su actividad antivibrio contra *Vibrio parahaemolyticus*, utilizando los métodos de difusión en discos y de concentración mínima inhibitoria. De los extractos analizados, solo el extracto etanólico de *Chaetoceros calcitrans* presentó efecto antibacteriano contra *V. parahaemolyticus* con halos de inhibición y concentración mínima inhibitoria de 22,3 ± 0,2 mm y 8 $\mu g.ml^{-1}$, respectivamente. Estos resultados evidencian el potencial que posee el extracto etanólico de la diatomea *C. calcitrans* como posible tratamiento de las vibriosis que suelen afectar a las granjas acuícolas.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Miguel Guevara	**ROL**	**CA** ☐ **A** ☐ **T** ☒ **JU** ☐
	CVLAC	
	e-mail	miguevara2003@yahoo.es
	e-mail	
Hernando Herrera	**ROL**	**CA** ☐ **A** ☐ **T** ☐ **JU** ☒
	CVLAC	
	e-mail	hherrera@udo.edu.ve
	e-mail	
Luzmila Alvarado	**ROL**	**CA** ☐ **A** ☐ **T** ☐ **JU** ☒
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	**Mes**	**Día**
04	12	2017

Lenguaje: spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-bravol.Doc	**Aplication/Word**

Alcance:

Espacial : **Nacional** (Opcional)

Temporal: **Temporal** (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciado en Bioanálisis.

Nivel Asociado con el Trabajo: LICENCIADO EN BIOANÁLISIS.

Área de Estudio: Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado: Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CU Nº 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda "SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC Nº 696/2009".

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR
FECHA 5/8/09 HORA 5:30

Cordialmente,

JUAN A. BOLAÑOS CURVELO
Secretario

REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA * UNIVERSIDAD DE ORIENTE * SECRETARÍA CONSEJO UNIVERSITARIO

C.C: *Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.*

JABC/YGC/maruja

Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

Articulo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009): "Los trabajos de grados son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Concejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Concejo Universitario, para su autorización".

Lusdalys Bravo

Miguel Guevara