



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
INSTITUTO OCEANOGRÁFICO DE VENEZUELA
COORDINACIÓN DE POSTGRADO EN CIENCIAS MARINAS
PROGRAMA DE MAESTRÍA MENCIÓN BIOLOGÍA MARINA

INFLUENCIA DE TRES PARÁMETROS DE CULTIVO SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS Y ANTIALGALES
POR LAS MICROALGAS *Chaetoceros calcitrans* Takano y *Dunaliella viridis*
Teodoresco

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO POR:

Licdo. Jesús Antonio Bello Pulido

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de *Magister Scientiarum* en Ciencias Marinas Mención Biología Marina

Cumana, 2021

INFLUENCIA DE TRES PARÁMETROS DE CULTIVO SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS Y ANTIALGALES
POR LAS MICROALGAS *Chaetoceros calcitrans* Takano y *Dunaliella viridis*

Teodoresco

APROBADO POR:



Prof. José Bernal
Asesor



Prof. Ivis Marina Fermín
Jurado



Prof. Dialys Bastardo
Jurado

ÍNDICE

DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
LISTA DE TABLAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
RESUMEN.....	VIII
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	7
GENERAL	7
ESPECÍFICOS	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
1.-Cepas de las microalgas	8
2.-Condiciones de cultivo.....	8
3.- Parámetros de crecimiento.....	8
4.- Productividad de biomasa.....	9
5.-Muestreos.....	9
6.-Preparación de los extractos	9
7.- Pruebas de actividad antimicrobiana	10
7.1. Actividad antibacteriana	10
7.2- Actividad antifúngica	11
8.- Actividad antialgal o alguicida	12
9.- Análisis de los resultados.....	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
Parámetros de crecimiento	13
Actividad antibacteriana.....	19

Actividad antifúngica	23
Actividad antialgal o alguicida.....	23
CONCLUSIONES	26
RECOMENDACIONES	27
BIBLIOGRAFIA	28
HOJA DE METADATOS	41

DEDICATORIA

A:

El doctor Miguel Guevara, insigne investigador en este campo de la Botánica, cuya incansable y admirable labor, le dio un sitio de honor con trascendencia internacional a este micro mundo vegetal en Venezuela; al igual dedico este trabajo todo el gran equipo del Laboratorio de Microalgas de la Universidad de Oriente, por mantener viva la esperanza en un área en crecimiento en el país.

A todos mil gracias....!!!

AGRADECIMIENTO

A:

Dios el creador de los cielos y la tierra y cuanto en ella hay, por la infinita sabiduría impartida en cada paso de ejecución de este trabajo de grado.

El Profesor Miguel Guevara, amigo y asesor. A usted mi infinito agradecimiento y mucho más....!!!!

José Bernal, por tomar las riendas en la culminación de este trabajo. Mil gracias amigo....!!!!

La profesora Mairín Lemus, por haberme abierto las puertas del Centro de Investigaciones Ecológicas de Guayacán, donde puede crecer como investigador de la Casa más Alta (UDO) y al profesor Natividad García por extenderme el permiso para asumir este reto como aspirante a maestría en Ciencias Marinas del IOV.

Todo el personal docente y administrativo del Postgrado en Ciencias Marinas del Instituto Oceanográfico de Venezuela, por todo el conocimiento y ayuda impartida durante mi estancia en sus aulas.

Mis padres Enellys y Jesús Bello; al igual que a mis hermanos Elizabeth, Gregorina, Dorina, Kleymer, Oswald, Kleydimel, y a mis sobrinos Jesús Miguel, Lennys, Cirelis, Karen, Ciribeth, Marielis, Kevin, Anthony, Howards, Juan José, Mariana, Victoria, Diego, Mia, Ariana, Estefany y Dilan, por formar parte de mis mejores momentos.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Microalgas, quienes hicieron placentera mi estadía durante los ensayos, seminarios internos y celebraciones como una gran familia. De toda la tropa que pasó por estas instalaciones, le agradezco de manera muy especial a: Roraysi Cortez, José Peñuela, Lolymer, Elvira, Rafael, Berenice, Dialys, Luis Freites, Saidelys, Heidi, Bladimir, Vilma, Josleidy, Luormarytz, Mercedes y Nina.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tasa instantánea de crecimiento (K, div/día) y productividad de biomasa (mg de biomasa/l/día) de <i>Chaetoceros calcitrans</i> cultivada a dos irradiancias (1000 y 10.000 lux) y en dos sistemas de cultivos (unialgal y bialgal).....	177
Tabla 2. Tasa instantánea de crecimiento (K, div/día) y productividad de biomasa (mg de biomasa/l/día) de <i>Dunaliella viridis</i> cultivada a dos irradiancias (1000 y 10.000 lux) y en dos sistemas de cultivos (unialgal y bialgal).....	188
Tabla 3. Diámetros de los halos de inhibición (mm) de los diferentes extractos contra diferentes cepas bacterianas.	20

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Curva de crecimiento de *Dunaliella viridis* cultivada de forma bialgal a baja (1000 lux) y alta irradiancia (10000 lux).....14
- Figura 2. Curvas de crecimiento de *Chaetoceros calcitrans*, cultivada de forma unialgal a baja (1000 lux) y alta irradiancia (10000 lux).....14
- Figura 3. Curvas de crecimiento de cultivos bialgales (*Chaetoceros calcitrans* + *Dunaliella viridis*) a baja (1000 lux. **a**) y alta irradiancia (10000 lux. **b**).....**¡Error! Marcador no definido.**6
- Figura 4. Tasa de crecimiento instantánea de los cultivos de *Chlorella vulgaris* expuestos a los diferentes extractos evaluados (300 µg de extracto/ml de cultivo).....**¡Error! Marcador no definido.**4

RESUMEN

El uso y abuso de fármacos convencionales para tratar diversas especies de hongos, bacterias y otras algas de interés para los seres humano, ha generado creciente interés biotecnológico entre los cultivos microalgales, pues muchas especies de algas han resultado efectivas contra especies nocivas para la humanidad. Por este motivo, en la presente investigación, se proyectó evaluar la influencia de la irradiancia, fase y tipo de cultivo sobre la producción de compuestos antimicrobianos y antialgales por las microalgas *Chaetoceros calcitrans* Takano y *Dunaliella viridis* Teodoresco, las cuales fueron suministradas por el Banco de Germoplasma de microalgas del Instituto Oceanográfico de Venezuela. Las microalgas se cultivaron por duplicado durante 30 días en medio f/2 Guillard. Los cultivos se realizaron de forma unialgal (*Chaetoceros calcitrans* y *Dunaliella viridis*) y bialgal (*Chaetoceros calcitrans* + *Dunaliella viridis*) en dos irradiancias (1000 y 10000 lux). Para determinar la productividad de biomasa, se realizaron análisis de masa seca cada 48 horas hasta el final del ensayo. La cosecha de la biomasa se realizó en la fase de crecimiento exponencial y estacionario. Los extractos fueron obtenidos con etanol y éter de petróleo, para finalmente probar su actividad biológica. La fracción etanólica, unialgal y bialgal de *C. calcitrans* a 10.000 lux, cosechada en la fase estacionaria mostraron actividad antibacteriana leve–moderada contra algunas cepas bacterianas (e.g., *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*); mientras que el extracto de éter de petróleo proveniente de la biomasa de *C. calcitrans* proveniente de la fase estacionaria a 10.000 lux, sólo mostró acción antibacteriana leve–moderada frente a *E. coli*; sin embargo, ninguno de los extractos manifestaron actividad antimicótica contra los hongos *Rhizopus orizae* y *Aspergillus niger*. Todos los extracto evaluados expresaron diferencias significativas ($p > 0,05$) ante crecimiento de *Chlorella vulgaris* como organismo revelador, siendo 4, 5, 15 y 16 los que causaron la mayor inhibición (59-80%) de esta microalga, con respecto al control. Se observa que la mayoría de los estos extractos alguicidas evaluados, provenían de las fracciones etanólicas, donde siempre estuvo presente *C. calcitrans*, ya sea cultivada de forma unialgal o bialgal.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos fotosintéticos oxigénicos que poseen clorofila *a* y otros pigmentos accesorios. Éstas presentan una gran variedad morfológica (unicelulares, filamentosas y coloniales), con tamaños que van desde el micrón hasta la centena de micrones y habitan diversos medios acuáticos, tales como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en el suelo, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes (ABALDE *et al.* 1995; SILVA *et al.* 2006; MITRA *et al.* 2012). De acuerdo con CAÑAVATE (2008), las algas microscópicas se dividen en dos grupos, las procariotas (Cyanophyta) y las eucariotas (Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Chrysophyceae, Cryptophyceae, Rodophyceae, Euglenophyceae, Haptophyceae y Phyrrophyceae, entre otras).

Además de la importancia ecológica que poseen las microalgas, por ser el primer eslabón en las cadenas tróficas, tanto en los cuerpos de agua marina como dulceacuícola, las mismas poseen un gran potencial como fuente de productos químicos, entre los que destacan: las vitaminas, minerales, carbohidratos, lípidos y proteínas; por lo que son utilizadas en las industrias cosméticas, textiles, como alternativa directa de alimentos, forraje, fertilizantes, combustibles, aunado a su uso como biorremediadores o en el tratamiento de aguas residuales, y en la elaboración de medicamentos (PROSPERI 2000; SILVA *et al.* 2006; PARK *et al.* 2011; ROSALES *et al.* 2016).

En el campo de la medicina, las microalgas han venido tomando auge como productoras de metabolitos bioactivos (PULZ & GROSS 2004; GOUVEIA *et al.* 2010; NARANJO-BRICEÑO *et al.* 2010; ZEPKA *et al.* 2010; RAPOSO *et al.* 2013; RAMÍREZ-MÉRIDA *et al.* 2015; MAO *et al.* 2017). Hasta la fecha se han logrado extraer e identificar numerosos compuestos con actividad biológica a partir de diversas especies de microalgas, en algunos casos con estructuras moleculares no encontradas en otros organismos y con potentes efectos sobre el crecimiento de diversas especies de hongos, bacterias y otras algas; de igual manera se han comprobado que presentan otras propiedades como: anticancerígenos, antioxidantes, antivirales, antitumorales,

antiinflamatorios, anticoagulantes, inmunosupresores, antifúngicas, bactericidas, entre otros (MUNDT *et al.* 2003; COLLA *et al.* 2004; NURBY *et al.* 2009; RAPOSO *et al.* 2013; SENHORINHO *et al.* 2015).

Desde el punto de vista antimicrobiano se presenta una alarmante problemática a nivel mundial, debido a la marcada tendencia de muchas cepas bacterianas y fúngicas a desarrollar resistencias frente a los antimicrobianos comúnmente empleados, constituyendo un serio problema al aplicar tratamientos contra enfermedades infecciosas (WHICHARD *et al.* 2007; RAMÍREZ & CASTAÑO 2009). Una de las principales causas a dicha resistencia se debe al uso indiscriminado de medicamentos (antibióticos), generalmente empleados en el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos patógenos, sin mencionar los efectos secundarios indeseables de ciertos antibióticos. De modo que la aparición de infecciones anteriormente comunes, han dado lugar a investigaciones enfocadas en la búsqueda de nuevas sustancias antibióticas de diversas fuentes, especialmente en las especies que integran la ficoflora acuática (COLLA *et al.* 2004; HERNÁNDEZ *et al.* 2008; NAVARRO *et al.* 2017).

Se conoce la existencia de datos que indican que, entre 1930 y 1940 es la fecha de partida en la que se demostró la producción de diversas sustancias biológicamente activas de algunas microalgas, siendo *Chlorella vulgaris*, la especie mejor evaluada y de la cual se logró identificar un ácido graso denominado chlorelina con actividad antibacteriana (ÖRDÖG *et al.* 2004). Desde entonces se han logrado avances significativos en esta área de la biotecnología. Dentro de los trabajos existentes se mencionan los de ÖRDÖG *et al.* (2004), quienes reportan la actividad inhibitoria de diez extractos metanólicos correspondientes a los géneros de las clorofitas *Desmococcus*, *Chlorella* y *Scenedesmus* contra diferentes cepas bacterianas Gram + y Gram -, mostrando altos niveles de actividad en casi todas las microalgas. Por su parte, CHU *et al.* (2004) reportan la actividad antibiótica de extractos etanólicos y acetónicos de dos especies de *Chlorella*, los cuales produjeron halos de inhibición de 2,4 mm de diámetro.

GHASEMI *et al.* (2007) estudiaron sesenta cepas de microalgas, de las cuales 21 mostraron actividad antibacteriana contra al menos una bacteria Gram + o Gram -, siendo 9 de ellas pertenecientes al género *Chlorella*. También se cuenta con la experiencia de KELLAM & WALKER (2007), quienes evaluando la actividad antibacteriana *in vitro* de 132 especies de microalgas, dentro de ellas *Chlorella stigmatophora*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sp.*, *Chroococcus dispersus* y *Nostoc muscorum*, encontraron actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

De igual manera, PÉREZ (2007) evaluó la actividad antimicrobiana de extractos hexánicos, clorofórmicos y metanólicos de *Oedogonium capillare* sobre ocho especies de bacterias, donde se observó un amplio espectro antibacteriano del extracto hexánico en comparación de los otros dos. Más tarde, ABEDIN *et al.* (2008), reportan la actividad antibacteriana y antifúngica en extractos acetónicos y metanólicos de dos clorofitas y dos cianobacterias, y ABHISHEK & KAUSHIK (2008) describieron el efecto inhibitorio de un extracto metanólico de *Spirullina platensis* sobre cuatro bacterias patógenas.

En el mismo orden de ideas, MO *et al.* (2009) lograron aislar de *Scytonema sp.*, un compuesto denominado Scytoscalarol, el cual resultó ser biológicamente activo contra *Mycobacterium tuberculosis* y *Staphylococcus aureus*. Mientras que, MO *et al.* (2010) comprobaron el efecto antibacteriano del alcaloide Fischambiguine B, aislado de la cianobacteria *Fischerrella ambigua*, frente a tres especies bacterianas (*Mycobacterium smegmatis*, *M. tuberculosis* y *S. aureus*).

Se ha informado que en diferentes especies de microalgas, bajo algunas condiciones ecológicas estresantes como cambios bruscos en las condiciones ambientales del medio, la competencia, la herbivoría y la densidad poblacional, entre otras, favorece la producción de metabolitos secundarios, los cuales son liberados a su entorno, constituyendo una herramienta estratégica para su defensa en un medio tan competitivo (BEN-AMOZT & AVRON 1983; MORALES *et al.* 2002; MORA *et al.*

2004; ÖRDÖG *et al.* 2004; AMSLER 2008; HERNÁNDEZ *et al.* 2008; ÁVALOS & PÉREZ-URRIA 2009; GARCÍA & PÉREZ. 2009; POSTEN 2009).

Bajo condiciones controladas, algunas investigaciones han demostrado la acción que ejercen las condiciones de cultivo y en especial la irradiancia sobre la producción de moléculas bioactivas en microalgas (MARTÍNEZ 2010; LOZANO 2012). Diversos trabajos han comprobado que la iluminación influye en muchas cianobacterias (*Spirulina platensis*, BALDIA *et al.* 1991; *Pseudanabaena galeata*, ROMO 1994 y *Anabaena* PCC7120, LORETO *et al.* 2003), observándose que muchas de ellas crecen de manera óptima a irradiancias bajas e intermedias, con un mejor aporte de metabolitos secundarios de diferentes naturalezas químicas. Por su parte, en el grupo de las clorofitas, GORDILLO *et al.* (1998) comprobaron el aumento de la concentración de pigmentos, proteínas y lípidos a bajas irradiancias en *Dunaliella viridis*; muy contrario a éstos, se tiene que RÜCKER *et al.* (1995) y PIROG *et al.* (2002) encontraron que a altas irradiancias aumentan las concentraciones de carotenoides y exopolisacáridos en cianobacterias.

Bajo este mismo enfoque, SCHAGERL & MÜLLER (2006) hallaron que niveles bajos de exposición lumínica en cuatro cepas de cianobacterias provocaron aumento del contenido de clorofila y carotenoides, y ROSALES *et al.* (2008) refieren el efecto de tres irradiancias en cultivos discontinuos sobre el crecimiento y producción de metabolitos (carbohidratos, clorofila a, β -caroteno, exopolisacáridos, lípidos, proteínas y zeaxantina) de la cianobacteria marina *Synechococcus* sp.

En lo que concierne a la influencia de las fases de cultivos en la síntesis de metabolitos secundarios, JAKI *et al.* (1999) y MIAN *et al.* (2003) reportan que en la fase estacionaria, las microalgas suelen producir estos compuestos. De manera contrastante, MORALES (2012) recalca que algunos extractos metanólicos en fase exponencial y estacionaria no presentaron ninguna actividad antimicrobiana, salvo los acuosos de *Scenedesmus quadricauda* cosechada en fase estacionaria ante una cepa Gram negativa.

Con respecto a las microalgas utilizadas en esta investigación, se tiene que *Chaetoceros calcitrans* es una diatomea planctónica, céntrica y cosmopolita, que mide entre 6-8 micras en su eje apical, tiene 4 setas o espinas. Las condiciones de cultivo son: temperatura entre 16 y 40°C, salinidades entre 28 y 40, con iluminación constante y fotoperiodo natural. Esta especie es ampliamente utilizada como alimento en los primeros estadios larvarios de camarones peneidos y durante todo el ciclo de vida de moluscos bivalvos (LÓPEZ-ELÍAS *et al.* 2004).

Con relación a *Dunaliella viridis*, pertenece a clase Chlorophyceae, es una célula verde-amarillo, posee 2 flagelos móviles, de forma ovoide con el extremo anterior agudo y el posterior redondo. Miden entre 9 y 11 micras de largo y 6 micras de diámetro. Es un alga eurihalina que crece a temperaturas de 16 a 28°C (TRAN *et al.* 2013). Esta especie se considera como un alimento adecuado para moluscos, algunos peces de agua dulce y crustáceos.

En Venezuela, las microalgas representan un recurso natural subvalorado y aun poco explotado desde el punto de vista científico e industrial. En los últimos años se han dado avances significativos en su cultivo y se han determinado diferentes usos de las mismas. Éstas se presentan hoy en día como otra opción alimentaria y farmacológica, y pueden utilizarse como fuente de energía, biofertilizantes o en el tratamiento de aguas residuales (TORRES 2012). Es evidente que a nivel nacional existe un vacío en el conocimiento de estos organismos en el campo antimicrobiano, con apenas el registro de ROSALES (2007), donde se evaluó la actividad biológica de extractos de la cianobacteria *Nostoc* LAUN 0015, en condiciones de laboratorio, frente a cuatro cepas bacterianas. Particularmente, para el estado Sucre se cuenta con los trabajos de BRAVO (2019), quien comprobó la capacidad inhibitoria de *Chaetoceros calcitrans* contra *Vibrio parahaemolyticus*, y el ROMERO (2019) donde se destacan la química y actividad biológica de una cepa nativa de *Spirulina subsalsa* cultivada en medio salino de bajo costo. Es por ello que en la presente investigación se pretende evaluar la influencia de tres parámetros de cultivo (irradiancia, fase y tipo de cultivo) sobre la producción de compuestos con actividad antibacteriana,

antifúngica y antialgal de las microalgas *Chaetoceros calcitrans* Takano y *Dunaliella viridis* Teodoresco, como un aporte a los avances biotecnológicos en el país.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar la influencia de la irradiancia, fase y tipo de cultivo sobre la producción de compuestos antimicrobianos y antialgales por las microalgas *Chaetoceros calcitrans* Takano y *Dunaliella viridis* Teodoresco.

ESPECÍFICOS

Determinar la influencia de la irradiancia sobre la producción de compuestos antimicrobianos y antialgales por las microalgas *C. calcitrans* y *D. viridis*.

Relacionar la influencia del tipo de cultivo sobre la producción de compuestos antimicrobianos y antialgales por las microalgas en estudio.

Determinar la influencia de la fase de cultivo sobre la producción de compuestos antimicrobianos y antialgales por las microalgas *C. calcitrans* y *D. viridis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.-Cepas de las microalgas

Las microalgas utilizadas en esta investigación fueron *Chaetoceros calcitrans* y *Dunaliella viridis*. Estas cepas se mantienen en el Banco de Germoplasma de algas de la Universidad de Oriente, Venezuela, con los códigos BGAUDO-58 y BGAUDO-21, respectivamente, bajo condiciones controladas de laboratorio (23 ± 1 °C, 100 $\mu\text{mol photons/ m}^2/\text{s}$, fotoperiodo de 12 horas luz: 12 horas oscuridad) en medio f/2 Guillard (GUILLARD 1975) a 37 UPS.

2.-Condiciones de cultivo

Las microalgas se cultivaron, axénicamente, por duplicado, durante 30 días en matraces con 1500 ml de medio f/2 Guillard (0,88 mmol/l de nitrógeno) a 23 ± 1 °C, pH de 7,8; fotoperiodo 12 horas luz: 12 horas oscuridad y con agitación manual dos veces al día. Los cultivos se realizaron de forma unialgal (*Chaetoceros calcitrans* sola, *Dunaliella viridis* sola) y bialgal (*Chaetoceros calcitrans* + *Dunaliella viridis*) en dos irradiancias (1000 y 10000 lux).

3.- Parámetros de crecimiento

La evaluación de la densidad celular se realizó cada 48 horas, para lo cual se tomaron muestras (1ml), por triplicado de cada tratamiento, y se fijaron con 50 μl de una solución de lugol al 10% para realizar el recuento celular por microscopía óptica, utilizando un hematocitómetro Neubauer de 0,1mm 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), de acuerdo con la siguiente ecuación y siguiendo las recomendaciones de MADIGAN *et al.* (1999).

$$K = \frac{\log_{10}X_1 - \log_{10}X_0}{0,301 \cdot (t_1 - t_0)}$$

Donde:

K = Tasa instantánea de crecimiento (div/día).

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

x_1, x_0 = Densidad celular final e inicial en fase de crecimiento exponencial.

4.- Productividad de biomasa

Para determinar la productividad de biomasa, se realizaron análisis de masa seca cada 48 horas hasta el final del ensayo mediante el sistema de filtración Millipore®, para lo cual se filtraron 5 ml, por quintuplicado, de cada cultivo 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. Con los datos de masa seca, se procedió a determinar la productividad de biomasa, mediante la siguiente ecuación, según HEMPEL *et al.* (2012).

Productividad, P (mg de biomasa/l/día)

$$P = \frac{\text{biomasa final (mg/l)} - \text{biomasa inicial (mg/l)}}{\text{Tiempo de cultivo}}$$

5.-Muestras

Una vez realizadas las curvas de crecimiento y evidenciadas las diferentes fases de crecimiento, se repitieron los cultivos bajo las mismas condiciones señaladas anteriormente. Cuando los cultivos alcanzaron la fase de crecimiento exponencial y estacionario se procedió a cosechar el total de la biomasa, mediante la centrifugación a 4000 rpm/10 min. Las biomásas obtenidas se mantuvieron congeladas hasta la preparación de los diferentes extractos y evaluación de la actividad antimicrobiana y alguicida.

6.-Preparación de los extractos

Las biomásas de las diferentes microalgas (10-15 g, aproximadamente) se sometieron a extracción, separadamente, con dos solventes de diferentes polaridades (etanol y

éter de petróleo). En cada solvente (50 ml), las biomásas se homogenizaron y se dejaron reposar durante siete días, para permitir la extracción de los metabolitos secundarios. A continuación, se filtró el material de extracción y el sobrenadante se colocó en una estufa a 37 °C para eliminar el solvente, obteniéndose así los diferentes extractos de cada una de las biomásas (24 extractos).

7.- Pruebas de actividad antimicrobiana

Las pruebas de actividad antimicrobiana (actividad antibacteriana y antifúngica) se realizaron para cada extracto, por triplicado. El diseño consistió en inocular cada organismo revelador, por separado, en placas de Petri que contenían el respectivo agar. Seguidamente, se colocaron sobre cada placa discos de papel Whatman N°3 de 10 mm de diámetro impregnados con las muestras a evaluar: control negativo (solventes de extracción), control positivo (antimicrobiano comercial) y los 24 extractos. A continuación, se dan detalles de cada prueba.

7.1. Actividad antibacteriana

El efecto antibacteriano de los diferentes extractos se evaluaron utilizando como organismos reveladores las cepas Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) y Gram positivas (*Bacillus cereus* ATCC y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538), mediante la técnica de difusión en agar o método del antibiograma, descrito por BAUER *et al.* (1966), en la cual discos estériles de papel de filtro Whatman N°3 de 10 mm de diámetro se impregnaron con 25 µl del extracto en prueba (40 mg/ml), lo cual proporciona una concentración final de 1000 µg de extracto/disco. Seguidamente, estos discos se colocaron sobre placas de Petri, previamente servidas con 12 ml de agar Mueller Hinton (HIMEDIA, Laboratorios Pvt. Limited, Bombay-India) e inoculadas, utilizando un hisopo de algodón estéril, con una suspensión bacteriana de concentración conocida (1 x 10⁸ células/ml) estandarizada por comparación con un patrón comercial McFarland 0,5. Posteriormente, las placas de Petri se preincubaron a 5 °C durante 12 horas para

facilitar que el extracto difunda en el medio de cultivo y luego se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas, para permitir el crecimiento bacteriano. Los extractos que contengan principios antibacterianos producirán un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos, el cual se midió mediante una regla graduada. En cada caso se colocaron en las placas discos impregnados con éter de petróleo y etanol (controles negativos) con la finalidad de descartar la posibilidad de que sean los solventes los que estén produciendo el halo de inhibición (ACOSTA *et al.* 2011).

7.2- Actividad antifúngica

Para la actividad antifúngica se utilizaron como organismos reveladores los hongos fitopatógenos: *Aspergillus niger* y *Rhizopus orizae*. El efecto antifúngico de los diferentes extractos se detectó según la técnica descrita por MADUBUNYI (1995), para lo cual, las especies de hongos se incubaron por un periodo de una semana a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, en tubos con Agar Papa Dextrosa (PDA) (PRONADIASA S. A. Hispanolab, S.A., Madrid). Transcurrido este tiempo, se le añadió a cada uno de los tubos 10 ml de agua destilada estéril, y luego se agitaron vigorosamente para remover las esporas y posteriormente se filtraron sobre gasa estéril. Las soluciones de conidios obtenidas se inocularon sobre cápsulas de Petri (1×10^6 conidios/ml), previamente servidas con PDA, por medio de hisopos estériles.

Finalmente, discos de papel de filtro Whatman N° 3 de 10 mm de diámetro impregnados con 25 ml del extracto en prueba (40 mg/ml) se colocaron sobre las placas inoculadas. Éstas se incubaron durante 48 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. La actividad antifúngica se verificó midiendo el diámetro del halo de inhibición (mm) producido por los extractos que posean propiedades antifúngicas, el cual se midió mediante una regla graduada (ACOSTA *et al.* 2011).

En cada caso se colocaron en las placas discos impregnados con éter de petróleo y etanol (controles negativos), con la finalidad de descartar la posibilidad de que sea el solvente el que esté produciendo el halo de inhibición.

8.- Actividad antialgal o alguicida

El efecto antialgal o alguicida de los diferentes extractos se evaluó utilizando a la microalga de agua dulce *Chlorella vulgaris* como organismo revelador. Esta especie se cultivó en 500 ml de medio Bristol (STARR & ZEIKUS 1987), utilizando agua destilada estéril. Los cultivos se agitaron manualmente dos veces al día y se realizaron en una cámara de crecimiento a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y una irradiancia de 1000lux.

La evaluación del efecto alguicida de cada extracto se efectuó por triplicado en tubos de ensayo que contenían 10 ml del cultivo de *C. vulgaris* en fase de crecimiento exponencial y con una densidad 1×10^6 cel/ml. Cada extracto se disolvió en Dimetilsulfóxido (DMSO) y se probó a una concentración de 300 μg de extracto/ml de cultivo. Como control positivo se utilizó CuSO_4 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), la cual es el empleado comúnmente como alguicida comercial (HELLIO *et al.* 2002). Como control negativo se usó un ml de DMSO. Los cultivos experimentales y controles se colocaron en la cámara de crecimiento a las mismas condiciones señaladas anteriormente, durante 12 días. Diariamente, los cultivos se agitaron manualmente y se les determinó los parámetros de crecimiento, como se explicó en el apartado 3. Los valores de las tasas de crecimiento instantánea de cada cultivo permitieron evaluar el efecto alguicida de los diferentes extractos.

9.- Análisis de los resultados

Los datos de la actividad antibacteriana, antifúngica y alguicida de los diferentes extractos (24) se contrastaron, separadamente, a través de un análisis de varianza de tres factores: irradiancia (1000 y 10000 lux), fase de cultivo (exponencial y estacionario) y tipo de cultivo (*Dunaliella viridis* unialgal, *C. calcitrans* unialgal y bialgal: *D. viridis* + *C. calcitrans*), siguiendo recomendaciones de SOKAL & ROLHF (1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros de crecimiento

En cultivos controlados la afectación en el crecimiento inicial y/o a lo largo de un determinado ensayo con microalgas, puede deberse a la acción sinérgica o individual de diversos factores ambientales –*e.g.*, la irradiancia, temperatura, salinidad-, además de los cambios en las concentraciones de los diferentes compuestos químicos nutricionales que componen el medio de cultivo (RADMANN *et al.* 2007; XIE *et al.* 2013; NAKANISHI & DEUCHI, 2014).

Los cultivos unialgales de las microalgas *Chaetoceros calcitrans* y *Dunaliella viridis*, se iniciaron con una densidad celular de 100.000 cél/ml; no obstante, durante las dos primeros días del ensayo, se observó, en ambos cultivos, una disminución en las densidades iniciales (Figura 1 y 2).

En la Figura 1 se evidencia que la densidad poblacional de *Chaetoceros calcitrans* en ambas irradiancias disminuyó con respecto a la densidad inicial, siendo esa disminución de un 45% en los cultivos sometidos a irradiancia baja (1000 lux) y 51,8% para los expuestos a irradiancia alta (10000 lux). El cultivo unialgal de *C. calcitrans* alcanzó la mayor densidad poblacional el día 10 (2.500.000 cel/ml) cuando se realizó a la mayor irradiancia.

Esta tendencia de disminución de la densidad poblacional durante las primeras 48 horas de cultivo fue similar para los cultivos unialgales de *D. viridis*, expuestos a baja y alta irradiancia, cuyo descenso, con relación a la densidad inicial, fue de un 43,27% y 50%, respectivamente (Figura 2). La mayor densidad poblacional de *D. viridis* fue de 1.480.214 cel/ml y se obtuvo en el día 8 cuando se cultivó a 10.000 lux.

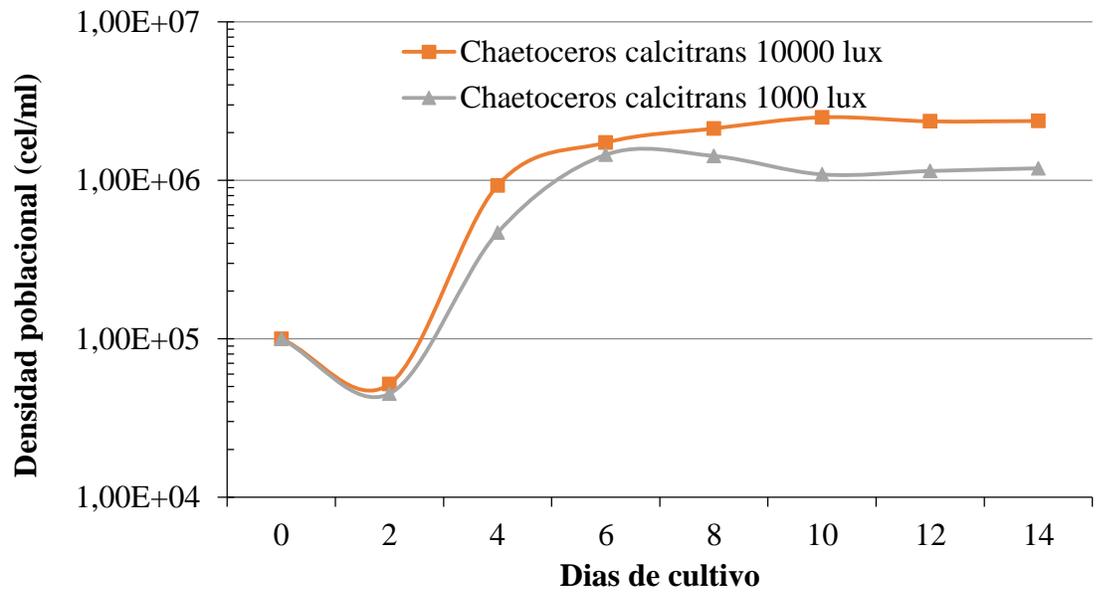


Figura 1. Curva de crecimiento de *Chaetoceros calcitrans*, cultivada de forma unialgal a baja (1000 lux) y alta irradiancia (10000 lux).

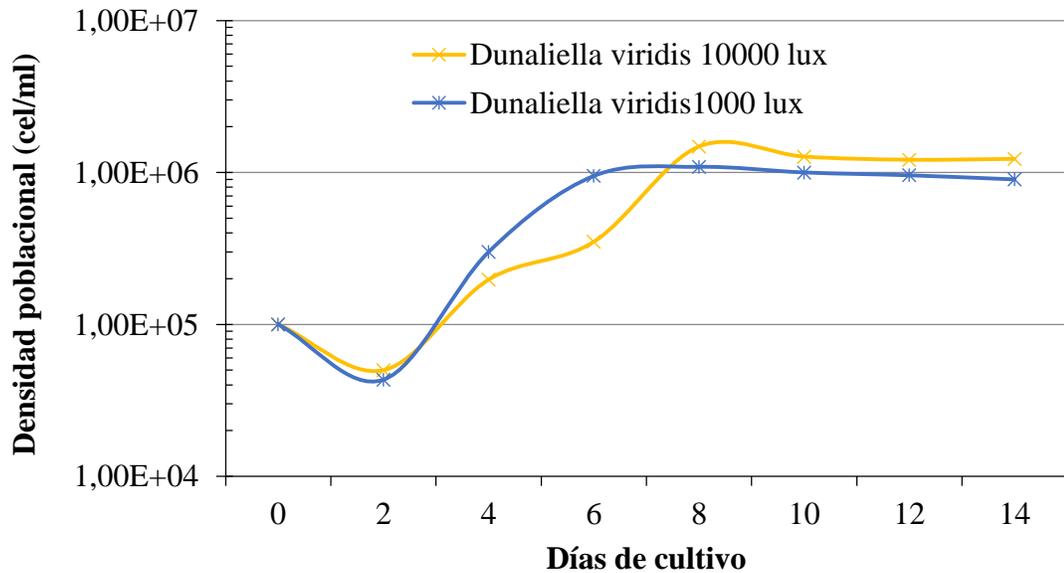


Figura 2. Curva de crecimiento de *Dunaliella viridis*, cultivada de forma bialgal a baja (1000 lux) y alta irradiancia (10.000 lux).

Con respecto a los cultivos bialgales (*Chaetoceros calcitrans* + *Dunaliella viridis*) a baja (1000 lux) y alta irradiancia (10000 lux), en la Figura 3a y 3b se observa, de forma similar a los cultivos unialgales, un decrecimiento de la densidad poblacional durante las primeras 48 horas. Posteriormente, bajo estas condiciones de cultivo, *C. calcitrans* aumentó su densidad poblacional hasta el 6to día, para mantenerse sin cambios hasta el final del ensayo (14 días). En este tipo de cultivo, la diatomea *C. calcitrans* también obtuvo su mayor densidad poblacional (1.725.000 cel/ml) a 10.000 lux (Figura 3b), pero al 6to día y con valores inferiores a los obtenidos en los cultivos unialgales (2.500.000 cel/ml; Figura 1).

La clorofita *D. viridis* al ser cultivada de forma bialgal tanto a 1000 lux como a 10.000 lux, presentó un descenso en su densidad poblacional hasta el cuarto día de cultivo (figura 3a y 3b), situación que no ocurrió en los cultivos unialgales (Figura 2). Esta microalga, en los cultivos unialgales, alcanzó densidades superiores a 1.000.000 cel/ml, pero cuando se cultivó simultáneamente con la diatomea *C. calcitrans* no superó las 40.000 cel/ml (Figura 3a y 3b).

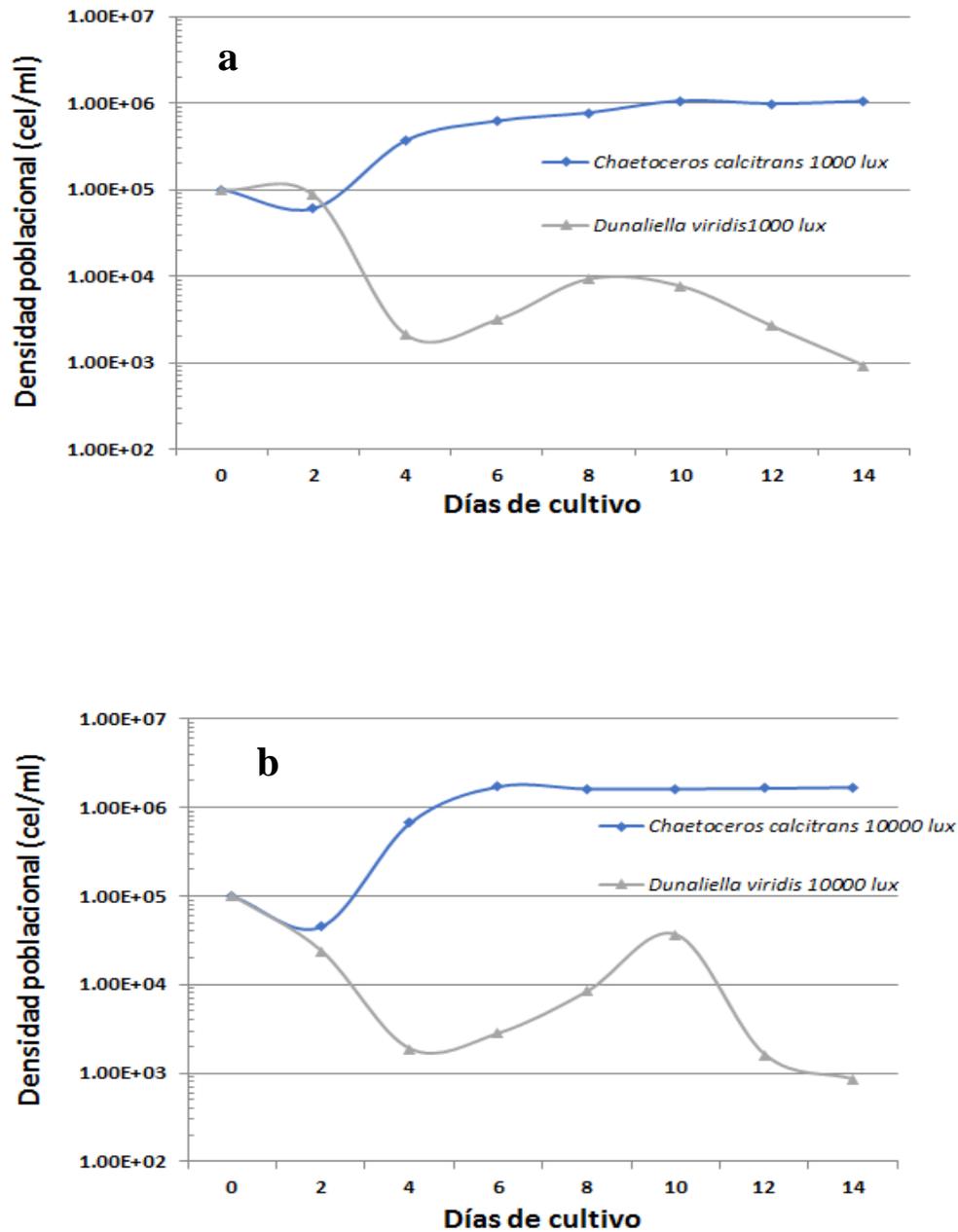


Figura 3. Curvas de crecimiento de cultivos bialgales (*Chaetoceros calcitrans* + *Dunaliella viridis*) a baja (1000 lux. **a**) y alta irradiancia (10000 lux. **b**).

La tasa instantánea de crecimiento (div/día) y la productividad de biomasa (mg de biomasa/l/día) de *Chaetoceros calcitrans* en la fase de cultivo exponencial y en las diferentes condiciones de cultivo se presenta en la Tabla 1. En esta microalga,

la tasa instantánea de crecimiento mostró diferencias significativas solo en la irradiancia ($p < 0.05$), alcanzando a 10.000 lux sus máximos valores (1.94-2.08 div/día). La productividad de biomasa; sin embargo, presentó diferencias significativas tanto en los sistemas de cultivo ($p < 0.05$), como en la irradiancias evaluadas ($p < 0.05$), siendo 10.000 lux y el sistema unialgal las condiciones que produjeron los mayores valores de esta variable (438.462,5±2714 mg /l/día).

Con respecto a *Dunaliella viridis*, las variables evaluadas mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$), en ambos factores (irradiancia y sistema de cultivo), alcanzando sus mayores valores en los sistemas unialgales y a 10.000 lux, con cifras de 0,81±0.02 div/día y 238.122,9±2011 mg de biomasa/l/día (tabla 2).

Tabla 1. Tasa instantánea de crecimiento (K, div/día) y productividad de biomasa (mg de biomasa/l/día) de *Chaetoceros calcitrans* cultivada a dos irradiancias (1000 y 10.000 lux) y en dos sistemas de cultivos (unialgal y bialgal)

<i>C. calcitrans</i>	Unialgal		Bialgal	
Irradiancia (lux)	1000	10.000	1000	10.000
K (div/día)	0,64±0,02 ^a	2,08±0,13 ^b	0,85±0,05 ^a	1,94±0,04 ^b
Productividad de biomasa (mg de biomasa/l/día)	225.000,0±5000 ^a	438.462,5±2714 ^b	141.257,7±1783 ^c	311.285,5±1873 ^d
<i>D. viridis</i>	Unialgal		Bialgal	
Irradiancia (lux)	1000	10.000	1000	10.000
K (div/día)	0,64±0,02 ^a	0,81±0,02 ^b	0,54±0,03 ^c	0,71±0,04 ^d
Productividad de biomasa (mg de biomasa/l/día)	174.580,0±386 ^a	238.122,9±2011 ^b	1.813,2± 44 ^c	5.729,7±55 ^d

Tabla 2. Tasa instantánea de crecimiento (K, div/día) y productividad de biomasa (mg de biomasa/l/día) de *Dunaliella viridis* cultivada a dos irradiancias (1000 y 10.000 lux) y en dos sistemas de cultivos (unialgal y bialgal)

Irradiancia (lux)	Unialgal		Bialgal	
	1000	10.000	1000	10.000
K (div/día)	0,64±0.02 ^a	0,81±0.02 ^b	0,54±0.03 ^c	0,71±0.04 ^d
Productividad de biomasa (mg de biomasa/l/día)	174.580,0±386 ^a	238.122,9±2011 ^b	1.813,2± 44 ^c	5.729,7±55 ^d

Los patrones de crecimiento observados en *Chaetoceros calcitrans* y *Dunaliella viridis* son análogos a los referidos para otras especies de microalgas sometidas condiciones de cultivo controlado. De esta forma, BRAVO (2017) para la misma especie de diatomea, al igual que para dos cepas de *C. muelleri*, cultivadas en ambientes controlados de laboratorio, bajo parámetros similares a los del presente estudio, observó durante los primeros días de cultivo, una disminución en las densidades iniciales, lo cual estaría relacionado con los períodos de aclimatación de los microorganismos sobrevivientes a los nuevos medios de cultivos. Al respecto, LUCERO & SIAVICHAY (2016) y GARCÍA *et al.* (2017) indicaron que en la fase de latencia, adaptación o inicial el incremento de la densidad celular es poco, ya que es una etapa donde de las células se aclimatan a las nuevas condiciones del medio. En este período, muchas enzimas metabólicas están inactivas y las concentraciones de materiales celulares caen a niveles que afectan a la división celular.

El crecimiento de *Dunaliella viridis* fue afectado cuando se cultivó de forma mixta con *Chaetoceros calcitrans*, siendo sus parámetros de crecimiento inferiores a los observados en los cultivos unialgales. Este bajo crecimiento observado en *D. viridis* puede deberse a un efecto alelopático por parte de *C. calcitrans*. En estos términos, varias postulaciones indican que la interacción de dos especies de microalgas puede promover alelopatía, dado que están compitiendo por espacio,

nutrientes, luz, entre otros factores (PISMA *et al.* 2001; PASSARGE *et al.* 2006; LAMPERT & SOMMER 2007). En general, el fitoplancton de menor tamaño (como *C. calcitrans*, de 4 a 7.5 μm ; *D. viridis*, de 4 a 12 μm) es un mejor competidor ante la deficiencia de recursos, ya que posee tasas de crecimiento más altas (MARAÑÓN *et al.* 2001; CUVIN-ARALAR *et al.* 2004; KAGAMI & URABE 2011).

Estudios previos con otras especies de microalgas –*e.g.*, *Chlorella sorokiniana*, *Dunaliella salina*, *Muriellopsis* sp.- han demostrado que las mayores tasas de crecimiento fueron registradas en los cultivos expuestos a más de 10.000 lux, tal como ocurrió en este bioensayo controlado. Lo que hace inferir que este pudiera ser el principal factor que condicione la densidad y biomasa celular de las especies estudiadas (GUEVARA *et al.* 2016; BASTARDO 2020; METSOVITI *et al.* 2020). Como ya se ha demostrado, los aumentos en la intensidad de la luz aumentan el crecimiento de las microalgas hasta un umbral fotoinhibidor, recalcando que este efecto puede variar según la especie (CHAVAN *et al.* 2014; CHIA *et al.* 2018).

Aunque en esta investigación no se identificaron los compuestos producidos por *C. calcitrans* y *D. viridis*, se ha demostrado en algunas especies de microalgas - *e.g.*, *Ankistrodesmus falcatus*, *Chlorella sorokiniana* y *Spirulina platensis*- la tendencia de aumentar el contenido de carotenos totales a exposiciones lumínicas altas, lo que ha sido atribuido como un mecanismo ecofisiológico fotoprotector (KUMAR *et al.* 2011; GEORGE *et al.* 2014). También ha sido referido que durante esta fase fotoprotectora se activa la síntesis de pigmentos accesorios, -*e.g.*, xantofilas, diadinoxantinas y diatoxantinas- los cuales participan en la prevención de daños al aparato fotosintético cuando está expuesto a elevadas irradiancias (BEN-AMOTZ & AVRON 1982; BOROWITZKA *et al.* 1984; RAD *et al.* 2015; BASTARDO 2020).

Actividad antibacteriana

Se analizaron 24 extractos obtenidos a partir de los cultivos unialgales y bialgales de las microalgas *Chaetoceros calcitrans* y *Dunaliella viridis*, encontrando que sólo tres de ellos mostraron actividad biológica, inhibiendo el crecimiento de las

bacterias Gram positivas *Bacillus cereus* ATCC y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* ATCC 10536, según lo reflejado en la Tabla 3. Llama la atención que las fracciones que mostraron bioactividad provienen de la fase estacionaria. Esta situación es mostrada por varios autores, quienes recalcan que en esta etapa del crecimiento, las microalgas producen y acumulan metabolitos secundarios tóxicos en el medio, como por ejemplo terpenos, alcaloides y pigmentos, como una respuesta al agotamiento de nutrientes en el medio, ya sea por competencia intra e interespecífica, lo que desencadena la producción de tales compuestos para eliminar la competencia entre poblaciones más densas en el cultivo (SETYANINGSIH *et al.* 2000; LAILATI 2007).

Tabla 3. Diámetros de los halos de inhibición (mm) de los diferentes extractos contra diferentes cepas bacterianas.

<i>Chaetoceros calcitrans</i>				
Condiciones de cultivo	Solvente	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>
Unialgal (10.000 lux, Fase estacionaria)	Etanol	11 ± 0,05	16 ± 0,01	13 ± 0,05
Bialgal (10.000 lux, Fase estacionaria)	Etanol	18 ± 0,03	20 ± 0,06	-
Bialgal (10.000 lux, Fase estacionaria)	Éter de petróleo	-	-	22 ± 0,08

El extracto etanólico de la biomasa obtenida del cultivo unialgal de *C. calcitrans*, cultivada a 10.000 lux de irradiancia y cosechada en fase estacionaria, resultó positivo contra las cepas bacterianas *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, con halos de inhibición de 16, 13 y 11 mm de diámetro, respectivamente (Tabla 3). Estos resultados coinciden con los reportados por SUSHANTH & RAJASHEKHAR (2015), quienes mostraron la bioactividad ejercida por el fracción etanólica, al igual que la metanólica y hexánica de esta esta misma diatomea contra *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Mientras que, WANG *et al.* (2010) demostraron que *Chaetoceros curvisetus* contiene una porción lipídica y algunos ácidos grasos que le confieren actividad antimicrobiana contra estas bacterias. Otros estudios donde se han empleado diatomeas como agentes reveladores

susceptibles a diferentes extractos microalgales, son los de VISO *et al.* (1987), quienes evidenciaron la actividad antimicrobiana de *Asterionella japonica* contra *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteos* y *Sarcina* sp.

Entre tanto que el extracto etanólico de la biomasa del cultivo bialgal (10.000 lux) en fase estacionaria, extraído bajo las mismas condiciones, sólo inhibió el desarrollo de las bacterias Gram positivas *B. cereus* (20 mm) y *S. aureus* (18 mm). Por su parte, el extracto en éter de petróleo que se obtuvo de la biomasa del cultivo bialgal (10.000 lux) fue activo sólo contra *E. coli*, con un halo de inhibición de 22 mm de diámetro (Tabla 3).

La bioactividad mostrada por los extractos etanólicos de la biomasa de *C. calcitrans* puede ser atribuida a la presencia de ciertos metabolitos secundarios como carotenoides, glucolípidos, esteroides, ácidos grasos y polifenoles, tal como lo infieren varios autores (VOLKMAN *et al.* 1980; YONGMANITICHAI & WARD 1989). Estudios recientes han permitido determinar que diferentes especies de diatomeas, incluyendo al género *Chaetoceros*, producen una importante cantidad de ácidos grasos (monoinsaturados y poliinsaturados), donde quedan incluidos los aceites esenciales (LEBEAU & ROBERT 2003; PACHECO-VEGA *et al.* 2010; FUAD *et al.* 2015), y que sean estos los responsables de la actividad antibacteriana de la cepa en estudio.

El espectro de actividad de los extractos evaluados se debe principalmente al tipo de metabolitos secundarios y su concentración presentes en cada uno de ellos. Entre las principales vías como un antimicrobiano puede presentar actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas tenemos la capacidad de romper la membrana celular bacteriana. Aunque en el presente estudio, no se caracterizó la naturaleza de los compuestos químicos de *C. calcitrans*, por referencia se sabe que los aceites esenciales presente en este grupo de diatomeas marinas están compuestos básicamente por terpenoides, siendo los sesquiterpenoides y meroterpenoides los que se obtienen con mayor frecuencia (JYOTIRMAYEE *et al.* 2014), cuyo mecanismo de acción está ligado con el aumento en la permeabilidad de

la membrana de las células bacterianas, lo que las haría más susceptibles a la acción de estos compuestos (GRIFFIN 2000).

Así mismo, otro grupo de compuestos de gran importancia identificados en este grupo de microalgas son las saponinas, las cuales son glúcidos que tienen la capacidad de formar complejos con el colesterol presente en las membranas celulares y producir grandes poros en las mismas, alterando la permeabilidad y morfología de las células microbianas. Al respecto, ARABSKI *et al.* (2009), señala que en las bacterias Gram negativas cuyas paredes celulares están cubiertas en un 90% por lipopolisacáridos, estos metabolitos secundarios tienen la capacidad de interactuar con el lípido A, aumentando significativamente la permeabilidad de la pared celular bacteriana. También se han aislado varios compuestos fenólicos como las quinonas, cumarinas y flavonoides, cuya actividad antibacteriana se ha asociado con la inhibición enzimática, incremento de la permeabilidad y rompimiento de membrana celular, entre otros mecanismos (SALEEM *et al.* 2010; AMARO *et al.* 2011). De igual manera, se ha comprobado la presencia de alcaloides en diatomeas, compuestos relacionados con la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos, debido a su capacidad de detener la síntesis de proteínas, inducir la apoptosis e inhibir las enzimas responsables en el metabolismo de carbohidratos (SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ *et al.* 2003).

Cabe destacar que la actividad antibacteriana observada en los extractos etanólicos y de éter de petróleo de *C. calcitrans*, puede deberse a un efecto sinérgico entre los distintos compuestos y no a uno en particular, y que además puedan estar relacionada a la presencia de más de un compuesto activo y la concentración de éstos en cada extracto, tal como lo recalca en su estudio NÁJERA *et al.* (2018) utilizando las diatomeas *Asterionella japonica* y *Biddulphia mobiliensis*.

Aunque en el presente ensayo, la especie *Dunaliella viridis* no manifestó actividad antibacteriana con los extractos unialgales, se ha determinado que en otras especies como *D. primolecta* se han purificado algunos componentes antibióticos con propiedades inhibitoria en el crecimiento de las bacterias *S. aureus*, *B. subtilis*, *B.*

cereus y *Enterobacter aerogenes* (CHANG *et al.* 1993); al igual que lo manifestó la fracción empleada de *D. tertiolecta* para *E. coli* y *S. aureus* (BECKER 1994) y *D. salina*, los expresó contra *E. coli*, *S. aureus*, *Listonella anguillarum*, *Lactococcus garvieae* y varias especies de *Vibrio* (HERRERO *et al.* 2006).

Actividad antifúngica

Los extractos obtenidos a partir de los cultivos unialgales y bialgales de las microalgas *Chaetoceros calcitrans* y *Dunaliella viridis*, no evidenciaron ninguna actividad antifúngica frente a los hongos fitopatógenos: *Rhizopus orizae* y *Aspergillus niger*. Probablemente, tales resultados pudieran estar vinculados con la dosis suministrada, la cual puede ser muy baja y no estar en el espectro idóneo para mostrar efecto inhibitorio en el crecimiento de estas especies blanco. Otro aspecto clave que se debe tomar en consideración es la naturaleza de las pared celular que presentan estas especies, la cual invariablemente de la taxa está constituida principalmente de polisacáridos como quitina, celulosa, glucanos y mananos, que constituyen el 90 % del peso seco de los hongos y el 10 % restante por proteínas, macromoléculas que pudieran ser una barrera biológicamente activa contra los metabolitos secundarios que pudieran estar presentes en los solventes utilizados en este estudio. También se ha señalado que la resistencia utilizada por los hongos es importante hacer referencia a la sobreproducción de blancos enzimáticos, la implementación de vías metabólicas alternas y la producción de bombas de flujo externo que expulsan los medicamentos al espacio extracelular (SEVILLA *et al.* 1998; MARR *et al.* 2002; GAVALDA & RUIZ 2003).

Actividad antialgal o alguicida

El crecimiento del organismo revelador (*Chlorella vulgaris*) mostro diferencias significativas ($p < 0.05$) en todos los extractos evaluados (Figura 4). La mayor inhibición de esta microalga (con respecto al control) estuvo entre 59-80%, ocasionada por los extractos 4, 5, 15 y 16 (Ver leyenda en Figura 4). Por otra parte, se

observó que ciertos extractos: 6, 9 y 19 (Ver leyenda en Figura 4) propiciaron el crecimiento de *C. vulgaris* entre un 27-36%, con respecto al control. Se observa que en estos extractos (la mayoría etanólicos) siempre estuvo presente *C. calcitrans*, ya sea cultivada de forma unialgal o bialgal.

Es importante acotar que el control del crecimiento masivo de microalgas que ocasionan severos daños ambientales y de salud es de suma importancia. Diversas estrategias, entre las que destacan métodos químicos (sulfato de cobre, hipoclorito de sodio, cloruro de potasio), físicos (filtros, radiaciones) y biológicos (peces herbívoros, algas y microorganismos) han sido propuestas para controlar o mitigar esta problemática (LE JEUNE *et al.* 2006; PARADA & IQUIZE, 2020; WINNICKI *et al.* 2021). Sin embargo, estas estrategias no han resultado tan efectivas debido a la toxicidad no selectiva, altos costos y baja eficiencia (WINNICKI *et al.* 2021). Es por ello que extractos provenientes de microalgas, podrían coadyuvar con la solución de esta problemática, dado que tendría menos efectos tóxicos para los sistemas biológicos y la salud humana.

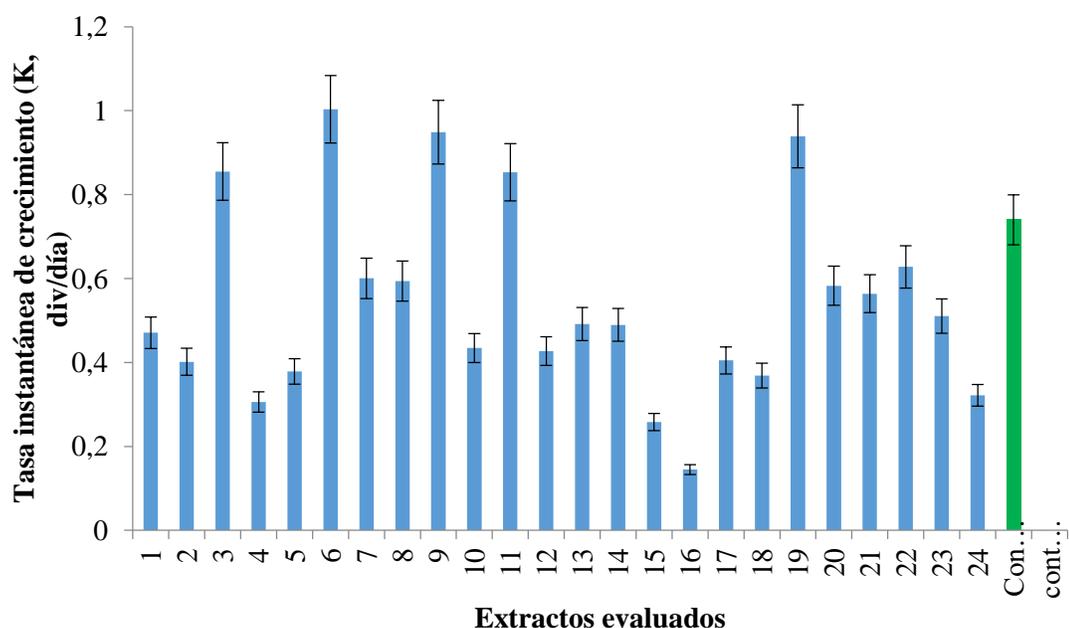


Figura 4. Tasa de crecimiento instantánea de los cultivos de *Chlorella vulgaris* expuestos a los diferentes extractos evaluados (300 µg de extracto/ml de cultivo).

1- Extracto etanólico de biomasa de *Dunaliella viridis* cultivada de forma unialgal a 1000 lux y cosechada en fase estacionaria, 2.-Extracto etanólico de biomasa del cultivo bialgal cultivada a 10.000 lux y cosechada en fase estacionaria,3.- Extracto etanólico de biomasa de *Dunaliella viridis* cultivada de forma unialgal a 10.000 lux y cosechada en fase estacionaria,4.- Extracto etanólico de biomasa de *Chaetoceros calcitrans* cultivada de forma unialgal a 1000 lux y cosechada en fase estacionaria, 5.- Extracto etanólico de biomasa de *Chaetoceros calcitrans* cultivada de forma unialgal a 10.000 lux y cosechada en fase estacionaria,6.-Extracto etanólico de biomasa del cultivo bialgal cultivada a 10.000 lux y cosechada en fase exponencial,7.- Extracto etanólico de biomasa de *Dunaliella viridis* cultivada de forma unialgal a 10.000 lux y cosechada en fase exponencial,8.- Extracto etanólico de biomasa de *Dunaliella viridis* cultivada de forma unialgal a 1.000 lux y cosechada en fase exponencial, 9.- Extracto etanólico de biomasa de *Chaetoceros calcitrans* cultivada de forma unialgal a 1.000 lux y cosechada en fase exponencial, 10.- Extracto etanólico de biomasa de *Chaetoceros calcitrans* cultivada de forma unialgal a 10.000 lux y cosechada en fase exponencial, 11.- Extracto en éter de biomasa de *Dunaliella viridis* cultivada de forma unialgal a 1.000 lux y cosechada en fase estacionaria, 12.-Extracto en éter de biomasa del cultivo bialgal cultivada a 1.000 lux y cosechada en fase estacionaria, 13.- Extracto en éter de biomasa de *Dunaliella viridis* cultivada de forma unialgal a 10.000 lux y cosechada en fase estacionaria,14.-Extracto en éter de biomasa de *Chaetoceros calcitrans* cultivada de forma unialgal a 1.000 lux y cosechada en fase estacionaria,15. Extracto en éter de biomasa de *Chaetoceros calcitrans* cultivada de forma unialgal a 10.000 lux y cosechada en fase estacionaria, 16.-Extracto en éter de biomasa del cultivo bialgal cultivada a 1.000 lux y cosechada en fase exponencial,17.-Extracto en éter de biomasa de *Dunaliella viridis* cultivada de forma unialgal a 10.000 lux y cosechada en fase exponencial, 18.-Extracto en éter de biomasa de *Dunaliella viridis* cultivada de forma unialgal a 1.000 lux y cosechada en fase exponencial, 19.- Extracto en éter de biomasa de *Chaetoceros calcitrans* cultivada de forma unialgal a 1.000 lux y cosechada en fase exponencial, 20.-Extracto en éter de biomasa de *Chaetoceros calcitrans* cultivada de forma unialgal a 10.000 lux y cosechada en fase exponencial, 21.-Extracto en éter de biomasa del cultivo bialgal cultivada a 10.000 lux y cosechada en fase estacionaria,22.-Extracto en éter de biomasa del cultivo bialgal cultivada a 10.000 lux y cosechada en fase exponencial, 23.-Extracto etanólico de biomasa del cultivo bialgal cultivada a 1.000 lux y cosechada en fase estacionaria, 24.- Extracto etanólico de biomasa del cultivo bialgal cultivada a 1.000 lux y cosechada en fase exponencial.

Extractos con efectos alguicidas, como los encontrados en esta investigación con la microalga *Chaetoceros calcitrans*, han sido referidos en otras microalgas. Al respecto, IKAWA *et al.* (199, 2004) informaron que el crecimiento de *Chlorella pyrenoidosa* fue inhibido por fracciones que contienen ácidos grasos de *Microcystis aeruginosa*. CHIANG *et al.* (2004) refirió que *Botryococcus braunii* posee compuestos químicos, tales como ácidos grasos que limitan el crecimiento de otras microalgas. El uso novedoso de *Chaetoceros calcitrans*, revela la necesidad de seguir ahondando en este singular campo, tanto en otras especies del género como en otros géneros microalgales, pues es poca la documentación de referencia que se tiene.

CONCLUSIONES

Los extractos etanólico, unialgales y bialgales de *C. calcitrans* a 10.000 lux y cosechados en la fase estacionaria mostraron actividad antibacteriana leve–moderada contra algunas cepas bacterianas en este ensayo; mientras que el extracto de Éter de petróleo proveniente de la biomasa de *C. calcitrans* cosechada en la fase estacionaria a 10.000 lux, sólo mostró acción antibacteriana leve-moderada frente a *E. coli*.

Las fracciones etanólicas y de éter de petróleo obtenidss a partir de los cultivos unialgales y bialgales de las microalgas *Chaetoceros calcitrans* y *Dunaliella viridis*, no mostraron actividad antifúngica contra los hongos fitopatógenos *Rhizopus orizae* y *Aspergillus niger*.

Todos los extractos evaluados mostraron diferencias significativas ante crecimiento de *Chlorella vulgaris* como organismo revelador, siendo 4, 5, 15 y 16 los que causaron la mayor inhibición de esta microalga (con respecto al control). Por otra parte, se observó que ciertos extractos: 6, 9 y 19 propiciaron el crecimiento de *C. vulgaris* entre un 27-36%, con respecto al control. Se observa que en estos extractos (la mayoría etanólicos) siempre estuvo presente *C. calcitrans*, ya sea cultivada de forma unialgal o bialgal.

RECOMENDACIONES

Modificar los parámetros físico-químicos del medio de cultivo, que puedan inducir a la formación de nuevos metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana y antialgal.

Caracterizar e identificar los compuesto que posean actividad antibacteriana, mediante técnicas como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía de gases, además de realizar estudios que permitan elucidar el mecanismo de acción y toxicidad del compuesto de interés.

Utilizar nuevas dosis y concentraciones que pudieran reflejar otra idea de la naturaleza inhibidora de los extractos evaluados.

Probar la actividad antibacteriana contra otros microorganismos patógenos, para conocer el espectro de inhibición de los compuestos producidos.

BIBLIOGRAFIA

- ABALDE, J., CID, A., FIDALGO, J., TORRES, E. & HERRERO, C. 1995. *Microalgas: cultivo y aplicaciones*. La Coruña, Servicio de Publicaciones. 210 pp.
- ABEDIN, M., RANIA A. & TAHA HALA, M. 2008. Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae. Evaluation of medium components by Plackett Burman design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*. *Global J. Biotech. Biochem.* 3(1): 22-31.
- ABHISHEK, CH. & KAUSHIK, P. 2008. In vitro antibacterial activity of laboratory grown culture of *Spirulina platensis*. *Indian J. Microbiology* 48(3): 348-352.
- ACOSTA, M., GUEVARA, M. & 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. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 40 (1): 25-39.
- AMARO , H., GUEDES, A. & MALCATA, F. 2011. Antimicrobial activities of microalgae: An invited review. Science against microbial pathogen: Communicating current research and technological advances. FORMATEX Microbiology 3(1): 1272-1280.
- AMSLER, D. 2008. *Algal sensory chemical ecology*. En: Amsler D. (Ed). *Algal Chemical Ecology*. Springer-Verlag, Berlin. 313 pp.
- ARABSKI, M., WASIK, S., DWORECKI, K. & KACA, W. 2009. Laser interferometric and cultivation methods for measurement of colistin/ ampicilin and saponin interactions with smooth and rough of *Proteus mirabilis* lipopolysaccharides and cells. *J. Microbiol. Methods.* 77(2): 178-183.
- ÁVALOS, A. & PÉREZ-URRIA, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca* 2(3): 119- 145.
- BALDIA, S., NISHIJIMA, T. & HATA, Y. 1991. Effects of physico-chemical factors and nutrients on the growth of *Spirulina platensis* isolated from Lake Kojima, Japan. *Suisan Gakkaishi. Bull. Jap. Soc. Sci.* 57: 481-490

- BASTARDO, D. 2020. Influencia de la irradiancia, salinidad y fase de cultivo en la producción de luteína por las microalgas *Muriellopsis* sp. Reisigl, 1964 y *Chlorella sorokiniana* Shihira & R.W. Krauss 1965. Trab. Grad. M. Sc. Ciencias Marinas, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 38 pp.
- BEN-AMOTZ, A. & AVRON, M. 1982. Accumulation of β -carotene in Halotolerant Algae: Purification and Characterization of β -carotene-rich Globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 18(4): 529-537.
- BAUER, A., KIRBY, W., SHERRIS, I. & TURK, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45(4): 493-496.
- BECKER, E.W. 1994. *Microalgae. Biotechnology and Microbiology*. Cambridge Univ. Press, Cambridge. 293 pp.
- BEN-AMOTZ, A. & AVRON, M. 1983. Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potential. *Ann. Rev. Microbiol.* 37:95-119.
- BOROWITZKA, L. BOROWITZKA, J. & MOULTON, T. 1984. The Mass Culture of *Dunaliella salina* for Fine Chemicals: From Laboratory to Pilot Plant. *Hydrobiologia*, 116/117(1): 115-121.
- BRAVO, L. 2017. Evaluación de microalgas marinas como productoras de compuestos inhibidores de *Vibrio parahaemolyticus*. Trab. Grad. Lic. Bioanálisis, Universidad de Oriente, Boca de Río, Venezuela, 33 pp.
- CAÑAVATE, J. 2008. Una visión integrada sobre el cultivo de microalgas para la producción de biocombustibles. IFAPA Centro El Toruño. Instituto de Investigación y Formación Agraria, Pesquera y de la producción Ecológica. Junta de Andalucía. España.
- COLLA, L., BERTOLIN, T. & COSTA, J. 2004. Fatty Acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperature and nitrogen concentrations. *Z. Naturforsch.* 59: 55-59.

- CUVIN-ARALAR, M.L., FOCKEN, U., BECKER, K., ARALAR, E.V. 2004. Effects of low nitrogen- phosphorus ratios in the phytoplankton community in Laguna de Bay, a shallow eutrophic lake in the Philippines. *Aquat. Ecol.* 38: 387-401.
- CHANG, T., OHTA, S., IKEGAMI, N., MIYATA, H., KASHIMOTO, T. & KONDO, M. 1993. Antibiotic substances produced by a marine green alga, *Dunaliella primolecta*. *Bioresour. Technol.* 44, 149-153.
- CHIANG, I.Z., HUANG, W.Y. & WU, J.T. 2004, 'Allelochemicals of *Botryococcus braunii* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 40: 474-480.
- CHAVAN, K., CHOUHAN, S., JAIN, S., SINGH, P., YADAV, M. & TIWARI, A. 2014. Environmental factors influencing algal biodiesel production. *Environmental Engineering Science* 31(11): 602- 611.
- CHIA, S., CHEW, K., SHOW, P., YAP, Y., ONG, H. & LING, T. 2018. Analysis of economic and environmental aspects of microalgae biorefinery for biofuels production: a review. *Biotechnol. J.* 1: 1-31.
- CHU, C., LIAO, W., HUANG, R. & LIN, P. 2004. Haemagglutinating and antibiotic activities of freshwater microalgae. *WorldJ. Microb. Biot.* 20: 817-825.
- FUAD, M.A.M., MOHAMMAD-NOOR, N., JALAL, A.K.C. & KAMARUZZAMAN, B.Y. 2015. Growth profile and fatty acid accumulation of four *Chaetoceros* taxa isolated from coastal. *Sains Malays.* 44(8)(2015): 1077-1084.
- GARCÍA, A. & PÉREZ, E. 2009. Metabolitos secundarios. Serie *Fisiología Vegetal* 2(3): 119-145.
- GARCÍA, J., PAVÍA, M., GARCÍA, T., CHIRIVELLA, J., & SERRANO, Á. 2017. Principios de Biotecnología y Bioingeniería en el cultivo de microalgas: importancia, problemas tecnológicos, tipos y sistemas de cultivos, crecimiento, factores limitantes, selección, aislamiento, escalado y caracterización bioquímica. *Nereis.* 9: 115-130.

- GEORGE, B.; PANCHA, I., DESSAI C., CHOKSHI K., PALIWAL, C., GHOSH, T. & MISHRA, S. 2014. Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus*: A potential strain for bio-fuel production. *Bioresour. Technol.* 171: 367-374.
- GHASEMI, Y., MORADIAN, A., MOHAGHEGHZADEH, A., SHOKRAVI, S. & HOSSEIN, M. 2007. Antifungal and Antibacterial Activity of the Microalgae Collected from Paddy Fields of Iran: Characterization of Antimicrobial Activity of *Chroococcus disperses*. *J. Biol. Scie.* 7: 904-910.
- GORDILLO, F., GOUTX, M., FIGUEROA, F. & NIELL, F. 1998. Effects of light intensity, CO₂ and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*. *J. Appl. Phycol.* 10: 135-144.
- GOUVEIA, L., MARQUES, A., SOUSA, J., MOURA, P. & BANDARA, M. 2010. Microalgae—source of natural bioactive molecules as functional ingredients. *Food Scien. & Technol. Bull: Functional Foods* 7: 21–37.
- GUEVARA, M., PINTO, R., VILLARROEL, J., HERNÁNDEZ, E., DÍAZ, R., GOTERA, B. & CORTEZ, R. 2016. Influencia de la salinidad y la irradiancia sobre el crecimiento y composición bioquímica de una nueva cepa de *Dunaliella salina*, proveniente de las salinas de Araya, Venezuela. *Saber.* 28(3): 494-501.
- 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.
- GRIFFIN, S. 2000. Aspects of antimicrobial activity of terpenoids and the relationship to their molecular structure. Thesis Doctor of Philosophy, University of Western Sidney, Penrith, 301 pp.

- HELLIO C., PONS, A. & BEAUPOIL, C. 2002. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 20:214-219.
- HEMPEL, N., PETRICK, I. & BEHRENDT, F. 2012. Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as key characteristics of suitability for biodiesel production *J. Appl. Phycol.* 24(6): 1407-1418.
- HERNÁNDEZ, A., VÁZQUEZ, R., SANCHEZ, M., SERRANO, I. & MARTÍNEZ, A. 2008. Biodiesel a partir de microalgas. Universidad Nacional Autónoma de México. *Artículo Biotecnología* 13(3): 38-61.
- HERRERO, M., IBÁÑEZ, E., CIFUENTES, A., REGLERO, G. & SANTOYO, S. 2006. *Dunaliella salina* microalga pressurized liquid extracts as Potential Antimicrobials. *J. Food Prot.* 69(10): 2471-2477.
- IKAWA, M., HANEY, J. & J. SASNER, 1996. Inhibition of *Chlorella* growth by the lipids of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Hydrobiologia* 331: 167-70.
- IKAWA, M., J. J. SASNER, & HANEY, J.F.. 2001. Activity of cyanobacterial and algal odor compounds found in lake waters on green alga *Chlorella pyrenoidosa* growth. *Hydrobiologia* 443: 19-22.
- JAKI, B., ORJALA, J., BÜRGI, H. & STICHER, O. 1999. Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharmaceut. Biol.* 37(2): 138-143.
- JYOTIRMAYEE, P., SACHIDANANDA, D. & BASANTA, K.D. 2014. Antibacterial activity of freshwater microalgae: A review. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 8(32): 809- 818.
- KAGAMI, M. & URABE, J. 2011. Phytoplankton growth rate as a function of cell size: an experimental test in Lake Biwa. *Limnology* 2(2): 111-117.
- KELLAM, J. & WALKER, J. 2007. Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture. *Brit. Phycol. J.* 24(2): 19-194.

- KUMAR, K., DASGUPTA, C., NAYAK, B., LINDBLAD, P. & DAS, D. 2011. Development of suitable photobioreactors for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. *Bioresour Technol.* 102(8):4945-4953.
- LAILATI, N. 2007. Metode ekstraksi dan uji aktivitas antibakteri dari ekstrak *Chaetoceros gracilis* [skripsi]. Bogor: Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- LAMPERT, W. & SOMMER, U. 2007. Limnoecology. Second Edition. Oxford University Press Inc., New York. 324 pp.
- LE JEUNE, A., CHARPÍN, M., DELUCHAT V., BRIAND, J., LENAIN, J., BAUDU, M. & AMBLARD, C. 2006. Effect of copper sulphate treatment on natural phytoplanktonic communities. *Aquatic toxicology.* 80: 267-280.
- LEBEAU, T. & JM ROBERT. 2003. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: Current and putative products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 624-632.
- LÓPEZ-ELÍAS, J.A., D. VOLTOLINA, M. NIEVES-SOTO & FIGUEROA-ORTIZ, L. 2004. *Producción y Composición de Microalgas en Laboratorios Comerciales del Noroeste de México.* En: *Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.* Eds. CRUZ-SUÁREZ, L.E., RICQUE-MARIE, D., NIETO LÓPEZ, M.G., VILLARREAL, D., SCHOLZ, U. & GONZÁLEZ, M. Hermosillo, Sonora, México. 636-649 pp.
- LORETO, C., ROSALES, N., BERMÚDEZ, J. & MORALES, E. 2003. Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. *Gayana Botánica* 60: 83-89.
- LOZANO, C. 2012. Detección de actividad antibiotica en cultivos de microalgas en dos fases de crecimiento. Trab. Grad. Esp. Biot, Universidad Autónoma Metropolitana, México D.f., México, 59 pp.
- LUCERO, D. & SIAVICHIA, L. 2016. Análisis de la influencia de diferentes fotoperiodos y concentración de nutrientes sobre la síntesis de polifenoles y carotenoides en

- especies cultivadas de *Chlorella* y *Nannochloropsis*. Trab. Grad. Lic. Bioquímico farmacéutico. Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador. 92 pp.
- MADIGAN, M., MARTINKO, J. & PARKER, J. 1999. *Brock Biología de los microorganismos*. Prentice Hall Iberia, Madrid, España. 1064 pp.
- MADUBUNYI, I. 1995. Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. *Intern. J. Pharm.* 33(3): 232-237.
- MAO, X., LIU, Z., SUN, Y. & LEE, S. 2017. Metabolic engineering for the microbial production of marine bioactive compounds. *Biotechnol Adv.* 358: 1004-1021.
- MARAÑÓN, E., HOLLIGAN, P.M., BARCIELA, R., GONZÁLEZ, N., MOURIÑO, B., PAZÓ, M.J. & VARELA, M. 2010. Patterns of phytoplankton size structure and productivity in contrasting open-ocean environments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 216: 43-56.
- MARTÍNEZ, A. 2010. Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta: Volvocales) cultivada en diferentes medios. Trab. Grad. Doct, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., México. 91 pp.
- METSOVITI, M., PAPAPOLYMEROU, G., KARAPANAGIOTIDIS, I. & KATSOULAS, N. 2020. Effect of Light Intensity and Quality on Growth Rate and Composition of *Chlorellavulgaris*. *Plants*. 9(31): 2-17.
- MIAN, P., HEILMANN, J., BÜRGI, H. & STICHER, O. 2003. Biological screening of terrestrial and freshwater cyanobacteria for antimicrobial activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharmaceut. Biol.* 41(4): 243-247.
- MITRA, D., VAN LEEUWEN, J. & LAMSAL, B. 2012. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. *Algal Research* 1(1): 40-48.

- MO, S., KRUNIC, A., PEGAN, S., FRANZBLAU, S. & ORJALAA, J. 2009. An antimicrobial guanidine-bearing sesterterpene from the culture cyanobacterium *Scytonema* sp. *J. Nat. Prod.* 72: 2043-2045.
- MO, S., KRUNIC, A., SANTARSIERO, B., FRANZBLAU, S. & ORJALAA, J. 2010. Hapalindole-related Alkaloids from the cultured cyanobacterium *Fischerella ambigua*. *Phytochemistry* 71(17&18): 2116-2123.
- MORA, R., MORONTA, R., ORTEGA, J. & MORALES, E. 2004. Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga *Chlorella* sp. aislada de la Represa de Tulé, Municipio Mara, Estado Zulia, Venezuela. *Ciencia* 12(2): 117-124.
- MORALES, E., RODRÍGUEZ, M., GARCÍA, D., LORETO C. & MARCO, E. 2002. Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 en función del pH y CO₂. *Interciencia* 27(7): 373-378.
- MORALES, C. 2012. Detención de actividad antibiótica en cultivos de microalgas en dos fases de crecimiento. Trab. Grad. Doct. Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F., México. 59 pp.
- MUNDT, S., KREITLOW, S. & JANSEN, R. 2003. Fatty acids with antibacterial activity from the cyanobacterium *Oscillatoria redekei* HUB 051. *J. App. Phycol.* 15(2): 263-267.
- NÁJERA-ARCE, C., ÁLVAREZ-FITZ, P., PÉREZ-CASTRO, D., TORIBIO-JIMÉNEZ, J. & CASTRO-ALARCÓN, N. 2018. Actividad antibacteriana de diatomeas marinas aisladas de Acapulco, Guerrero, México. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 53(2): 195-207.
- NAKANISHI, K. & DEUCHI, K. 2014. Culture of a high-chlorophyll-producing and halotolerant *Chlorella vulgaris*. *J. Biosci. Bioeng.* 117: 617-619.

- NARANJO-BRICEÑO, L., ROJAS-TORTOLERO, D., GONZÁLEZ, H., TORRES, R., ZEGARRA, J., SENA-D'ANNA, L. & SOSA DEL CASTILLO, D. 2010. *Arthrospira platensis* como biofactoría de metabolitos secundarios de interés farmacológico: el ácido piperólico. *Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal.* 1(1): 64-90.
- NAVARRO, F., FORJÁN, E., VÁZQUEZ, M., TOIMIL, A., MONTERO, Z., RUIZ-DOMÍNGUEZ, M., GARBAYO, I., CASTAÑO, M., VÍLCHEZ, C. & VEGA, J. 2017. Antimicrobial activity of the acidophilic eukaryotic microalga *Coccomyxa onubensis*. *Phycological Research*, 65: 38-43.
- NURBY, G., JIMÉNEZ, J., YÁNEZ, C., GARCÍA, M., DI BERNARDO, M. & GUALTIERI, M. 2009. Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas marinas venezolanas. *Rev. Peru. Biol.* 16(1): 097-100.
- ÖRDÖG, V., STIRK, W., LENOBEL, R., BANCÍROVÁ, M., STRNAD, J., SZIGETI, J. & NÉMETH, L. 2004. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. *J. Appl. Phycol.* 16: 309-314.
- PACHECO-VEGA, J.M., CADENA-ROA, M.A., SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M.P., TOVAR-RAMÍREZ, D. & DÁVALOS, C.R. 2010. Effect of culture medium and nutrient concentration on fatty acid content of *Chaetoceros muelleri*. *RELBA* 1: 6-15.
- PARADA, R. & IQUIZE, E. 2020. Efecto del sulfato de cobre e hipoclorito de sodio en el control de la floración algal y DL50 en alevines de Tambaqui (*Piaractus brachypomus*) en la zona La Jota del municipio de Chimoré. *Apthapi.* 6(3): 2082-2093
- PARK, J., CRAGGS, R. & SHILTON, A. 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresour. Technol.* 102: 35-42.

- PASSARGE, J., HOL, S., ESCHER, M. & HUISMAN, J. 2006. Competition for nutrients and light: stable coexistence, alternative stable states, or competitive exclusion? *Ecol. Monogr.* 76(1): 57-72.
- PÉREZ, R. 2007. Actividad antimicrobiana de *Oedogonium capillare*. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 38(3): 26-29.
- PIROG, T., GRINBERG, T. & MALASHENKO, Y. 2002. Strategy of obtaining microbial exopolisaccharides possessing stable preset properties. *Microbiol.* 64: 81-94.
- PISMAN, T.I., PECHURKIN, N.X. & SOMOVA, L.A. 2001. Competition between links in "producer-consumer" trophic chains in an aquatic closed system with spatially separated components. *Adv. Space Res.* 27(9): 1599-1603.
- POSTEN, C. 2009. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Eng. Life Sci.* 9(3): 165-177.
- PROSPERI, C. 2000. Cyanobacteria in human affairs. *Interciencia* 25 (6): 303-306.
- PULZ, O. & GROSS, W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65(6): 635-486.
- RAD, F., AKSOZ, N. & HEJAZI, M. 2015. Effect of saltness on the growth and production of β -carotene in isolated *Dunaliella* sp. microalga from qom salt lake of Iran. *Int. J. Biosci.* 6 (2): 164-171.
- RADMANN, E., REINEHR, C. & COSTA J. 2007. Otimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. *Aquaculture* 265: 118-126.
- RAMÍREZ, L. & CASTAÑO, M. 2009. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica* 42: 263-268.

- RAMÍREZ-MÉRIDA, L., RAGAGNIN DE MENEZES, C., QUEIROZ, L. & JACOB-LOPES, E. 2015. Microalgas: potencial para la producción de compuestos bioactivos nanoencapsulados. *Ciência e Natura* 37: 07-17.
- RAPOSO, M., MORAIS, R. & MORAIS, A. 2013. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *LifeSci.* 93(15): 479-486.
- ROMERO, L. 2019. Estudio químico y actividad biológica de una cepa nativa de *Spirulina subsalsa* cultivada en medio salino de bajo costo. Trab. Grad. PhD. Ciencias Marinas, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 95 pp
- ROSALES, N. 2007. Evaluación de la actividad biológica de extractos de la cianobacteria *Nostoc* Laun 0015, en condiciones de laboratorio. Trab. Grad. M. Sc. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. 7 pp.
- ROSALES-LOAIZA, N., GUEVARA, M., LODEIROS, C. & MORALES, E. 2008. Crecimiento y producción de metabolitos de la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. (Chroococcales) en función de la irradiancia. *Rev. Biol. Trop.* 56(2): 421-429.
- ROSALES, N., VERA P., AIELLO-MAZZARRI, C. & MORALES E. 2016. Comparative growth and biochemical composition of four strains of *Nostoc* and *Anabaena* (Cyanobacteria, Nostocales) in relation to sodium nitrate. *Acta Biol. Colomb.* 21(2):347-354.
- RÜCKER, J., KOHL, J. & KAISER, K. 1995. Response of carotenoids to variations of growth-limiting factors in three filamentous blue-green algae. *Algol. Studies.* 77: 51-65.
- SALEEM, M., NAZIR, M., ALI, M.S., HUSSAIN, H., LEE, Y.S., RAIZ, N. & JABBAR, A. 2010. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat. Prod. Rep.* 27: 238-254.
- SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ, G., PORTA-DUCOING, H. & ROCHA-SOSA, M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Rev. Mex. Fitopato.* 21(3): 355-363.

- SCHAGERL, M. & MÜLLER, B. 2006. Acclimation of chlorophyll a and carotenoid levels to different irradiances in four freshwater cyanobacteria. *J. Plant. Physiol.* 163: 709-716.
- SENHORINHO, G. N. A., ROSS, G. M. & SCOTT, J. A. 2015. Cyanobacteria and eukaryotic microalgae as potential sources and antibiotics. *Phycologia* 54: 271-82.
- SETYANINGSIH, I., SUPTIJAH, P., IBRAHIM, B. & SUWANDI, R. 2000. Extraction of bioactive compound from *Chlorella* sp. and its application on fresh fish. Di dalam: Proceeding of International Symposium on Marine Biotechnology (ISMB). Jakarta: *Indonesia*, 29-31.
- SILVA, A., SILI, C. & TORZILLO, G. 2006. Cyanoprocaryota y microalgas (Chlorophyceae y Bacillariophyceae) betónicas dominantes en ríos de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 56(4): 221-235.
- SOKAL, R. & ROHLF, F. 2003. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3rd edn. Freeman, New York, NY. 915 pp.
- STARR, R. & ZEIKUS, J. 1987. UTEX-de culture collection of algae at University of Texas at Austin. *J. Phycol.* 22: 1-47.
- SUSHANTH, V.R & RAJASHEKHAR, M. 2015. Antioxidant and antimicrobial activities in the four species of marine microalgae isolated from Arabian Sea of Karnataka coast. *Indian J. Geo-Mar. Sci.* 44(1): 69-75.
- TORRES, R. 2012. Aspectos ecológicos de microalgas con potenciales biotecnológicos. Trab. Grad. Doct. Biología, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela, 150 pp.
- TRAN, D., LOUIME, C., VÕ, T., GIORDANO, M., PORTILLA, S., DOAN, N., TRAN, D., MAI, T. & BUI, L. 2013. Identification of *Dunaliella Viridis* Using ITS Markers. *Int. J. Appl. Sci.* 3(4): 118-126.

- VISO, A.C., PESANDO, K. & BABY, C. 1987. Antibacterial and antifungal properties of some marine diatoms in culture. *Bot. Mar.* 30: 41-45.
- VOLKMAN, J.K., EGLINTON, G. & CORNER, EDS. 1980. Sterols and fatty acids of the marine dinoflagellate *Biddulphia sinensis*. *Phytochemistry* 19: 1809-1813
- WANG, Q., LIU, C., ZHANG, S., SUN, L. & WANG, C. 2010. Extraction and antimicrobial effect of active components from *Chaetoceros curvisetus*. *Food Science* 31(5): 180-183.
- WHICHARD, J., GAY, M., STEVENSON, K., JOYCE, J., COOPER, K., OMONDI, K., MEDALLA, M., JACOBY, F. & BARRETT, T. 2007. Human *Salmonella* and concurrent decreased susceptibility to quinolones and extended-spectrum cephalosporins. *Emerg. Infect. Dis.* 13(11): 1681-1688.
- WINNICKI, K., ŁUDZIK, K., ŻABKA, A., POLIT, J., ZAWISZA, A. & MASZEWSKI, J. 2021. Antialgal activity of the 12-5-12 gemini surfactant results from its impact on the photosynthetic apparatus. *Sci. Rep.* 11:2360.

HOJA DE METADATOS

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

Título	INFLUENCIA DE TRES PARÁMETROS DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS Y ANTIALGALES POR LAS MICROALGAS <i>Chaetoceros calcitrans</i> Takano y <i>Dunaliella viridis</i> Teodoresco
Subtítulo	

Autor (es):

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Bello Pulido Jesús Antonio	CVLAC	11826733
	e-mail	<i>jesusantoniobello@gmail.com</i>
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Biotecnología, microalgas, actividad biológica, metabolitos secundarios

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias Marinas	Biotecnología

Resumen (abstract):

. El uso y abuso de fármacos convencionales para tratar diversas especies de hongos, bacterias y otras algas de interés para los seres humano, ha generado creciente interés biotecnológico entre los cultivos microalgales, pues muchas especies de algas han resultado efectivas contra especies nocivas para la humanidad. Por este motivo, en la presente investigación, se proyectó evaluar la influencia de la irradiancia, fase y tipo de cultivo sobre la producción de compuestos antimicrobianos y antialgales por las microalgas *Chaetoceros calcitrans* Takano y *Dunaliella viridis* Teodoresco, las cuales fueron suministradas por el Banco de Germoplasma de microalgas del Instituto Oceanográfico de Venezuela. Las microalgas se cultivaron por duplicado durante 30 días en medio f/2 Guillard. Los cultivos se realizaron de forma unialgal (*Chaetoceros calcitrans* y *Dunaliella viridis*) y bialgal (*Chaetoceros calcitrans* + *Dunaliella viridis*) en dos irradiancias (1000 y 10000 lux). Para determinar la productividad de biomasa, se realizaron análisis de masa seca cada 48 horas hasta el final del ensayo. La cosecha de la biomasa se realizó en la fase de crecimiento exponencial y estacionario. Los extractos fueron obtenidos con etanol y éter de petróleo, para finalmente probar su actividad biológica. La fracción etanólica, unialgal y bialgal de *C. calcitrans* a 10.000 lux, cosechada en la fase estacionaria mostraron actividad antibacteriana leve–moderada contra algunas cepas bacterianas (*e.g.*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*); mientras que el extracto de éter de petróleo proveniente de la biomasa de *C. calcitrans* proveniente de la fase estacionaria a 10.000 lux, sólo mostró acción antibacteriana leve–moderada frente a *E. coli*; sin embargo, ninguno de los extractos manifestaron actividad antimicótica contra los hongos *Rhizopus orizae* y *Aspergillus niger*. Todos los extracto evaluados expresaron diferencias significativas ($p > 0,05$) ante crecimiento de *Chlorella vulgaris* como organismo revelador, siendo 4, 5, 15 y 16 los que causaron la mayor inhibición (59-80%) de esta microalga, con respecto al control. Se observa que la mayoría de los estos extractos alguicidas evaluados, provenían de las fracciones etanólicas, donde siempre estuvo presente *C. calcitrans*, ya sea cultivada de forma unialgal o bialgal.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
José Felix Bernal	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	9.939.686
	e-mail	<i>josefelixbernal@gmail.com</i>
	e-mail	
.	ROL	CA <input checked="" type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2021	07	29

Lenguaje: spa

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

Archivo (s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TG-BELLO.doc	Word 1997-2003

Alcance:

Espacial: Nacional (Opcional)

Temporal: Temporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

DOCTOR EN CIENCIA MARINAS

Nivel Asociado con el Trabajo: Magíster

Área de Estudio: Biología Marina

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

UNIVERSIDAD DE ORIENTE, NÚCLEO DE SUCRE

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



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°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 N° 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.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA

RECIBIDO POR *Martínez*

FECHA 5/8/09 HORA 5:30

hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

Juan A. Bolaños Cuvells

JUAN A. BOLANOS CUVELLS
Secretario



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

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

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009): “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.



AUTOR



Prof. José Bernal
Asesor